

**Charakterisierung onkologischer
Medikamentenkandidaten durch Analyse
der zellulären Signalübertragung**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Yvonne Heubach
aus Reutlingen

Tübingen
2013

Tag der mündlichen Qualifikation:

30.04.2013

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Stevanović

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Ulrich Rothbauer

DANKE!

Diese Arbeit wurde am NMI – Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut an der Universität Tübingen – in der Arbeitsgruppe Assayentwicklung durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Prof. Dr. Stefan Stevanović gilt mein besonderer Dank für die Betreuung dieser Arbeit. Für die Übernahme des Zweitgutachtens möchte ich **Prof. Dr. Ulrich Rothbauer** danken.

Bei **Dr. Markus Templin** bedanke ich mich für die hervorragende Betreuung während dieser Arbeit. Besonders danken möchte ich Markus für viele gewinnbringende Diskussionen und Denkanstöße sowie das Ermöglichen meines Forschungsaufenthalts in den USA.

Massimo Cristofanilli, MD, danke ich für die Möglichkeit wertvolle Erfahrungen in seinem Labor am Fox Chase Cancer Center in Philadelphia zu sammeln.

Dem gesamten **Spher4Sys-Konsortium** danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit, insbesondere **SpheroTec GmbH** und **4SC AG** für die Generierung der Sphäroid- und Monolayerproben. Außerdem danke ich der 4SC AG für die Bereitstellung der proprietären Antitumorsubstanzen. Mein herzlicher Dank gilt hier **Dr. Hella Kohlhof** und **Dr. Stefan Strobl** für ihr Engagement und ihre tatkräftige Unterstützung. Für die gute Zusammenarbeit danke ich **PD Dr. Barbara Mayer**. Auf NMI-Seite bedanke ich mich bei **Dr. Michael Pawlak** für die Leitung und Organisation des Projekts sowie gewinnbringende Diskussionen. **Ewa Breiting** danke ich herzlich für ihre Unterstützung.

Dr. Oliver Pötz und **Cornelia Sommersdorf** danke ich für die Bereitstellung des von ihnen entwickelten Peptidarrays zur Charakterisierung von Anti-Histon-Antikörpern. Oliver danke ich zudem für ergiebige Diskussionen, Cornelia für die Unterstützung bei der Durchführung des Peptidarrays sowie der Western Blots. Für die Generierung der HeLa-Zellproben danke ich **Julia Maier**.

Hannes Planatscher gilt ein besonderer Dank für die statistische Unterstützung dieser Arbeit. Sein stets offenes Ohr sowie seine Fähigkeit sich schnell in neue Fragestellungen hineinzudenken weiß ich sehr zu schätzen.

Anette Döttinger und **Andreas Uhl** möchte ich herzlich für ihre Mithilfe bei der Durchführung der Western Blots danken. Bei Andreas und **Antje-Katharina Hummel** bedanke ich mich für die praktische Unterstützung der Antikörpercharakterisierung, außerdem danke ich Andreas für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Für viele ergiebige Diskussionen, Tipps und Ideen gilt mein besonderer Dank **Dr. Thomas Knorpp**. Von ihm erlernte ich wichtige Fähigkeiten, die mir im Laufe dieser Arbeit stets hilfreich waren. Thomas sowie **Berthold Gierke** gilt mein Dank für ihre Unterstützung bei der Herstellung der Mikroarray-Chips. **Dr. Ute Metzger** danke ich für ihre liebenswürdige Art mit der sie mich stets unterstützt hat, ihre Hilfsbereitschaft sowie die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Assayentwicklung, Protein Profiling und Biochemie danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft. Ganz besonders danke ich allen Doktoranden für die tolle Zeit, die wir auch außerhalb des Labors hatten und an die ich immer gerne zurückdenken werde.

Meiner Schwester **Anja** danke ich von ganzem Herzen für jegliche Unterstützung, die nötige Ablenkung sowie die kritische Korrektur dieser Arbeit.

Matthias gilt mein ganz besonderer Dank für seine Rücksichtnahme, Unterstützung und dafür, dass er nicht müde wurde mich aufzumuntern und immer für mich da ist.

Nicht zuletzt möchte ich **meinen Eltern** Ruth und Wilhelm dafür danken, dass sie mich auf meinem Weg stets mit allen Kräften und Mitteln unterstützen – ohne euch wäre das nicht möglich gewesen – deshalb ist euch diese Arbeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

DANKE!	I
INHALTSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX
TABELLENVERZEICHNIS	XI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XIII
1. EINLEITUNG	1
1.1 TUMORENTSTEHUNG	1
1.2 THERAPIEN ZUR BEHANDLUNG VON TUMOREN	4
1.2.1 Antimitotische Substanzen	5
1.2.2 Histon-Deacetylase-Inhibitoren	6
1.3 EPIGENETISCHE FAKTOREN ZUR REGULATION DER GENEXPRESSION.....	9
1.3.1 Phosphorylierungen von Histon H3 in der Interphase	10
1.3.2 Phosphorylierungen von Histon H3 in der Mitose	11
1.4 SPHÄROIDE ZUR TESTUNG DER WIRKSAMKEIT VON ANTITUMORSUBSTANZEN	12
1.5 PROTEIN-MIKROARRAYS	14
1.5.1 <i>Reverse Phase</i> Protein-Mikroarrays.....	16
1.5.2 Mikrosphärenbasierte Protein-Mikroarrays.....	17
2. ZIELSETZUNG	19
3. MATERIAL UND METHODEN.....	21
3.1 MATERIALIEN	21
3.1.1 Geräte	21
3.1.2 Software.....	22
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	23
3.1.4 Puffer und Reagenzien.....	23
3.1.5 Chemikalien.....	25
3.1.6 Antikörper	26
3.1.7 Antitumorsubstanzen	27
3.1.8 Zelllinien.....	27
3.1.9 Primäres Patientenmaterial.....	28
3.1.10 Monolayer- und Sphäroidproben	29
3.2 BIOCHEMISCHE METHODEN	31
3.2.1 Lyophilisierung der Proben	31
3.2.2 Denaturierende Probenlyse.....	32
3.2.3 Native Probenlyse	32
3.2.4 Proteinbestimmung nach Bradford	32

3.2.5	Proteinbestimmung nach Lowry	33
3.2.6	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
3.2.7	Western Blot	33
3.2.8	Charakterisierung von Antikörpern für den Einsatz im <i>Reverse Phase</i> Protein-Mikroarray	34
3.3	MIKROARRAY-METHODEN	36
3.3.1	Herstellung von <i>Reverse Phase</i> Protein-Mikroarrays	36
3.3.2	Bestimmung der immobilisierten Proteinmenge	38
3.3.3	Immunoassay auf planaren Protein-Mikroarrays	38
3.3.4	Bildanalyse von planaren Protein-Mikroarrays	39
3.3.5	Mikrosphärenbasierter Peptidarray	42
3.4	DARSTELLUNG UND ANALYSE VON DATENSÄTZEN	43
3.4.1	Fehlerfortpflanzung	43
3.4.2	Datentransformation	43
3.4.3	Hierarchische Clusteranalysen	44
3.4.4	Statistische Signifikanztests	44
3.4.5	Datenevaluierung des Peptidarrays	45
4.	ERGEBNISSE	47
4.1	METHODENENTWICKLUNG	47
4.1.1	Bestimmung der pro Behandlungskondition benötigten Anzahl an Sphäroiden	47
4.1.2	Probenpräparation mittels Lyophilisierung	48
4.1.3	Vergleich des Wachstumsverhaltens von Sphäroiden aus den Zelllinien HT-29 und NCCIT	53
4.2	PROTEINEXPRESSIONSANALYSE IN PATIENTEN-SPHÄROIDEN	54
4.3	ANALYSE DER WIRKPROFILE VERSCHIEDENER ANTITUMORSUBSTANZEN AUF PROTEINEBENE	59
4.3.1	Wirkung der Histon-Deacetylase-Inhibitoren C1 und C2 auf Sphäroide der Zelllinie NCCIT	60
4.3.2	Wirkung der Antitumorsubstanzen C1, C2 und C5 auf Sphäroide der Zelllinie HT-29	72
4.3.3	Wirkung der Antitumorsubstanzen C1, C2 und C5 auf Histonebene	88
4.3.4	Verifizierung der RPPA-Analysen mittels Western Blot	103
5.	DISKUSSION	107
5.1	METHODENETABLIERUNG	109
5.1.1	Kombination von Sphäroid- und RPPA-Technologie	109
5.1.2	Einsatz eines mikrosphärenbasierten Peptidarrays zur Charakterisierung modifikationsspezifischer Anti-Histon-Antikörper	110
5.2	ANALYSE DER WIRKUNG EINES NEUARTIGEN KINESIN-INHIBITORS	113
5.3	ANALYSE DER WIRKUNG EINES NEUARTIGEN HISTON-DEACETYLASE- INHIBITORS AUS DER KLASSE DER HYDROXAMSÄUREN	123

5.3.1	Wirkung der Histon-Deacetylase-Inhibitoren auf Stammzellcharakteristika	131
5.4	ANALYSE DER WIRKUNG EINES NEUARTIGEN HISTON-DEACETYLASE-INHIBITORS AUS DER KLASSE DER BENZAMIDE	134
6.	ZUSAMMENFASSUNG	141
7.	ABSTRACT	143
8.	LITERATURVERZEICHNIS	145
9.	ANHANG	163
10.	PUBLIKATIONSLISTE	177
10.1	PUBLIKATIONEN	177
10.2	KONGRESSVORTRÄGE	177
10.3	POSTERPRÄSENTATIONEN	177

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die sechs Kennzeichen von Tumorzellen nach Hanahan und Weinberg.....	2
Abbildung 2: Strukturformeln zweier Histon-Deacetylase-Inhibitoren	7
Abbildung 3: Effekte von Histon-Deacetylase-Inhibitoren auf Tumorzellen	8
Abbildung 4: Vergleich der Formate von Protein-Mikroarrays.....	15
Abbildung 5: Darstellung eines Mikroarray-Chips.....	17
Abbildung 6: Unterschiede im Expressions- und Phosphorylierungsstatus von Proteinen durch die Probenpräparation	51
Abbildung 7: Relativer Phosphorylierungsstatus der Proteine Akt und ERK1/2.....	52
Abbildung 8: Zusammenhang zwischen Wachstumsverhalten und Proteingehalt von Sphäroiden.....	53
Abbildung 9: RPPA-Analyse der Expression von Proteinen in primären humanen Tumorsphäroiden im Vergleich zu HT-29-Zellliniensphäroiden.....	56
Abbildung 10: Optimierung der RPPA-Analyse von primären humanen Tumorsphäroiden durch Erhöhung der auf dem Mikroarray-Chip immobilisierten Proteinmenge	58
Abbildung 11: Analyse des Proteingehalts von NCCIT-Sphäroiden während der 48-stündigen Behandlungsdauer	61
Abbildung 12: Zeitverlauf des GAPDH-Signals ohne und mit Normierung auf die im Mikrospot immobilisierte Proteinmenge	62
Abbildung 13: Änderungen im Modifikations- und Expressionszustand von Proteinen durch Behandlung von NCCIT-Sphäroiden mit C1.....	64
Abbildung 14: Modifikations- und Expressionsstatus differenziell regulierter Proteine nach Behandlung von NCCIT-Sphäroiden mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor C1	65
Abbildung 15: Zeitverlauf der Expression und Modifikation ausgewählter Proteine nach Behandlung von NCCIT-Sphäroiden mit C1	66
Abbildung 16: Änderungen im Modifikations- und Expressionszustand von Proteinen durch Behandlung von NCCIT-Sphäroiden mit C2.....	69
Abbildung 17: Modifikations- und Expressionsstatus differenziell regulierter Proteine nach Behandlung von NCCIT-Sphäroiden mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor C2	70
Abbildung 18: Zeitverlauf der Expression und Modifikation ausgewählter Proteine nach Behandlung von NCCIT-Sphäroiden mit C2	71

Abbildung 19: Proteingehalt der HT-29-Sphäroide nach Behandlung mit den proprietären Leitstrukturen C1, C2 und C5 im Vergleich zur DMSO-Kontrollbehandlung.....	73
Abbildung 20: Änderungen im Modifikations- und Expressionszustand von Proteinen durch Behandlung von HT-29-Sphäroiden mit C1, C2 und C5	76
Abbildung 21: Änderungen im Modifikations- und Expressionszustand von Proteinen durch Behandlung von HT-29-Sphäroiden mit C1	79
Abbildung 22: Änderungen im Modifikations- und Expressionszustand von Proteinen durch Behandlung von HT-29-Sphäroiden mit C2	84
Abbildung 23: Änderungen im Modifikations- und Expressionszustand von Proteinen durch Behandlung von HT-29-Sphäroiden mit C5	87
Abbildung 24: Beeinflussung der Antikörperbindung durch benachbarte Modifikationen im Epitop	96
Abbildung 25: Acetylierung (K9) und Phosphorylierung (S10) von Histon H3 nach Behandlung von HeLa-Zellen mit Colcemid oder Paclitaxel	97
Abbildung 26: Zeitverläufe der Modifikation von Histonen nach Behandlung von NCCIT-Sphäroiden mit C1 und C2.....	99
Abbildung 27: Acetylierung der Histone nach Behandlung von HT-29-Sphäroiden mit C1, C2 und C5	101
Abbildung 28: Phosphorylierung der Histone nach Behandlung von HT-29-Sphäroiden mit C1, C2 und C5	103
Abbildung 29: Verifizierung der RPPA-Analysen mittels Western Blot	104
Abbildung 30: Verifizierung der RPPA-Analysen mittels Western Blot	106
Abbildung 31: Analyse der Bindungscharakteristika von Anti-Histon-Antikörpern	111
Abbildung 32: Mitosearrest der HT-29-Zellen nach Behandlung mit einem Eg5-Inhibitor	115
Abbildung 33: Aktivierung der mTOR- und MAPK-Signalwege durch den Eg5-Inhibitor .	118
Abbildung 34: Modell für die Wirkung des Eg5-Inhibitors auf unterschiedliche Zelltypen im Sphäroid	121
Abbildung 35: Modell der Inhibition von HSP90 durch Histon-Deacetylase-Inhibitoren .	126
Abbildung 36: Regulation der zellulären Lokalisation von STAT3.....	129
Abbildung 37: Einfluss der Acetylierung von Spindelproteinen auf die Aktivierung des Spindel-Kontrollpunkts.....	137

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Detektionsantikörper	26
Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Antitumorsubstanzen der 4SC AG	27
Tabelle 3: Mutationsstatus der Zelllinie HT-29	28
Tabelle 4: Mutationsstatus der Zelllinie NCCIT	28
Tabelle 5: Behandlungsbedingungen für die HT-29-Sphäroide	30
Tabelle 6: Behandlungsbedingungen der NCCIT-Sphäroide für die RPPA-Analyse.....	30
Tabelle 7: Behandlungsbedingungen der NCCIT-Sphäroide für die Western Blot-Analyse	31
Tabelle 8: Verwendete Volumina an Lysepuffer	32
Tabelle 9: Verdünnung der Sphäroidproben für den Druck der Protein-Mikroarrays.....	37
Tabelle 10: Einstellungen am ZeptoREADER zur Detektion der immobilisierten Proteinmenge	38
Tabelle 11: Einstellungen am ZeptoREADER zur Detektion der Immunoassays	39
Tabelle 12: Proteinbestimmung der Sphäroide	48
Tabelle 13: Auswirkung der Präparationsmethode auf den Proteingehalt der HT-29-Zelllysate	49
Tabelle 14: RPPA-Analyse von primären Patienten-Sphäroiden.....	55
Tabelle 15 Faktoren der Änderungen des Modifikations- und Expressionszustands von Proteinen durch Behandlung von HT-29-Sphäroiden mit C1.....	76
Tabelle 17 Faktoren der Änderungen im Modifikations- und Expressionszustand von Proteinen durch Behandlung von HT-29-Sphäroiden mit C5.....	86
Tabelle 18 Klassifizierung der mittels Peptidarrays analysierten Anti-Histon-Antikörper..	91
Tabelle 19 Kreuzreaktivitäten relevanter Anti-Histon-Antikörper nach Analyse mittels Peptidarrays.....	92
Tabelle 20: Primärantikörper	163
Tabelle 21: Hersteller der verwendeten Antikörper	169
Tabelle 22: Probenliste	169

Abkürzungsverzeichnis

17-AAG	17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin
5-FU	Fluoruracil
ac	acetyliert
APC	Anaphase-promovierender Komplex (<i>anaphase-promoting complex</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
AU	willkürliche Einheiten (<i>arbitrary units</i>)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
cl	gespalten (<i>cleaved</i>)
COG	<i>center of gravity</i>
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CTCL	T-Zelllymphom
CV	Variationskoeffizient (<i>coefficient of variation</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
ECL	gesteigerte Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transition
Fab	variabler, antigenbindender Teil eines Antikörpers
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (<i>fibroblast growth factor</i>)
FKS	fetales Kälberserum
FOLFIRI	Therapieschema zur Chemotherapie bestehend aus Fluoruracil, Folinsäure und Irinotecan
FOLFOX	Therapieschema zur Chemotherapie bestehend aus Fluoruracil, Folinsäure und Oxaliplatin
g	Erdbeschleunigung
gt	Ziege (<i>goat</i>)
H + L	schwere und leichte Kette eines Antikörpers
HAT	Histon-Acetyltransferase
HBSS	Hanks Salzlösung (<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>)
HDAC	Histon-Deacetylase
HDACi	Histon-Deacetylase-Inhibitor
HMT	Histon-Methyltransferase
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IEG	unmittelbar frühes Gen (<i>immediate early gene</i>)

IgG	Immunglobulin G
IKK	I κ B-Kinase-Holokomplex
KDM	Histon-Demethylase
LDS	Lithiumdodecylsulfat
Lyo	Gefriertrockner
me	methyliert
me1	monomethyliert
me2	dimethyliert
me3	trimethyliert
MFI	mittlere Fluoreszenzintensitäten (<i>mean fluorescence intensities</i>)
MFU	Mittelwert der relativen Fluoreszenzeinheiten (<i>mean fluorescence units</i>)
MPF	Mitose promovierender Faktor (<i>mitosis promoting factor</i>)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
ms	Maus
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
na	nicht anwendbar
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
NSCLC	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (<i>non small cell lung carcinoma</i>)
p	phosphoryliert
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBST	phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween 20
PA	Peptidarray zur Charakterisierung von Anti-Histon-Antikörpern
PE	Phycoerythrin
PPV	positiver Vorhersagewert (<i>positive predictive value</i>)
PWG	planarer Wellenleiter (<i>planar waveguide</i>)
R	Verhältnis der modifizierten Form eines Proteins zu seiner Gesamtform
rb	Kaninchen (<i>rabbit</i>)
RFI	relative Fluoreszenzintensität (<i>relative fluorescence intensities</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RPPA	<i>Reverse Phase</i> Protein-Mikroarray
rt	Ratte
RV	Restvolumen PBS
SAC	Spindel-Kontrollpunkt (<i>spindle assembly checkpoint</i>)
SAHA	Suberoylanilid Hydroxamsäure
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SV	Vakuumrotationsverdampfer (<i>SpeedVac</i>)
Sz	Spezies
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TIP	<i>Plus-end tracking protein</i>
Verd.	Verdünnung
WB	Western Blot
z. B.	zum Beispiel
Zn ⁺	Zinkion

Es wurden die gängigen SI-Einheiten verwendet. Die Abkürzung von Aminosäuren erfolgte nach dem internationalen Einbuchstabencode. Protein- und Gennamen wurden analog zur UniProtKB Protein-Datenbank abgekürzt. Gennamen wurden gemäß der allgemeinen Konvention kursiv geschrieben. Fremdsprachige Ausdrücke wurden ebenfalls kursiv geschrieben. Der Ausdruck Expression wurde synonym zur gemessenen Proteinmenge verwendet.

1. Einleitung

1.1 Tumorentstehung

In gesundem Gewebe wird die Zell-Homöostase durch eine strenge Regulation von Wachstumssignalen und Zellzyklus kontrolliert. Somit wird die Zellzahl konstant gehalten und Gewebearchitektur und -funktion werden aufrechterhalten. Kommt es jedoch zur Deregulation dieses fein aufeinander abgestimmten Zusammenspiels, können Tumoren entstehen. Diese zeichnen sich durch deregulierte Apoptose und unkontrolliertes Zellwachstum aus und können gesundes Gewebe verdrängen und zerstören. Maligne Tumoren, welche landläufig als Krebs bezeichnet werden, besitzen die Fähigkeit, Metastasen in anderen Körperregionen zu bilden, was eine schlechte Prognose zur Folge hat. Da es sich bei der Tumorentstehung um einen mehrstufigen Prozess handelt, der sich über Jahre entwickelt, treten Tumoren gehäuft mit steigendem Alter auf. Mutationen in der DNA, welche über Jahre akkumulieren, führen letztendlich zur Inhibition von Tumorsuppressorproteinen bzw. zur Aktivierung von Onkogenen. Auslöser solcher Mutationen stellen Karzinogene dar, welche beispielsweise in Tabakrauch, Abgasen oder in der Nahrung zu finden sind. Des Weiteren können virale Infektionen oder verschiedene Arten von Strahlung Mutationen und somit Krebs auslösen.

Aber nicht nur die mutierten Zellen, sondern auch deren Mikroumgebung tragen zur Tumorentstehung bei. Um die Komplexität der Tumorbilogie zu verstehen, wurden von Hanahan und Weinberg (2000) in einer viel beachteten Publikation sechs Kennzeichen von Krebszellen beschrieben (Abbildung 1). Demnach besitzen Tumorzellen die folgenden Eigenschaften:

- Aufrechterhaltung proliferativer Signalwege
- Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumssuppressoren
- Resistenz gegenüber Zelltod
- Erlangung replikativer Unsterblichkeit
- Induktion von Angiogenese
- Aktivierung von Invasion und Metastasierung

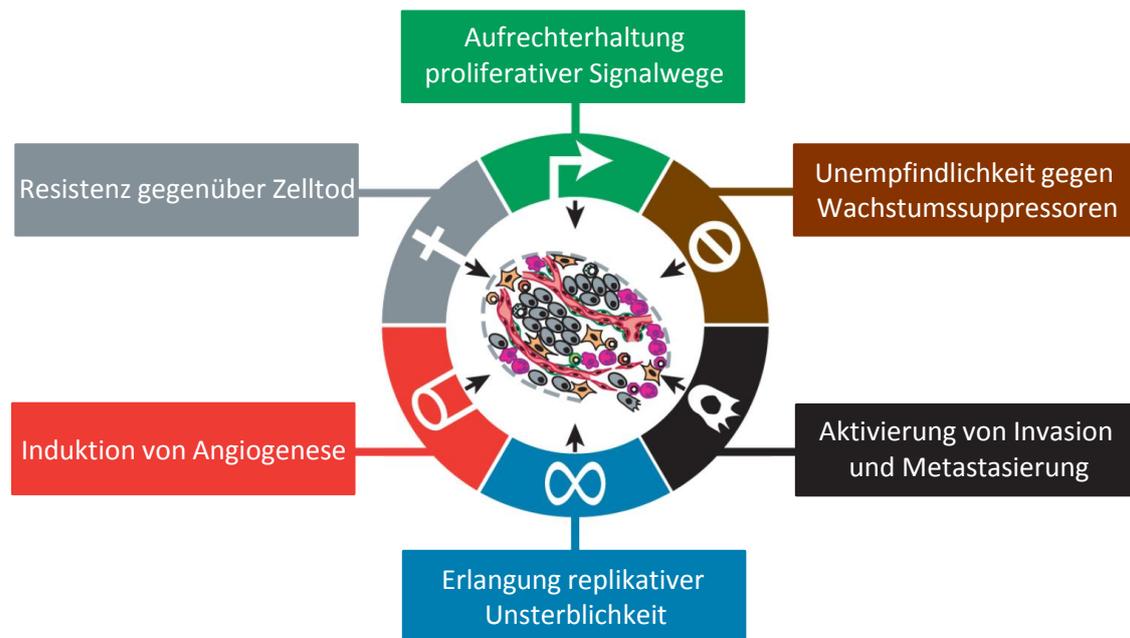


Abbildung 1: Die sechs Kennzeichen von Tumorzellen nach Hanahan und Weinberg

Tumorzellen besitzen die Fähigkeit, proliferative Signalwege aufrechtzuerhalten, sind unempfindlich gegenüber Wachstumssuppressoren und resistent gegenüber Zelltod. Sie erlangen replikative Unsterblichkeit, induzieren Angiogenese und aktivieren Invasion und Metastasierung. Abbildung modifiziert nach Hanahan und Weinberg (2011).

Die markanteste Eigenschaft von Tumorzellen ist sicherlich die anhaltende Proliferation, welche unter anderem durch eine verstärkte Expression von Wachstumsfaktoren oder Rezeptoren bedingt sein kann. Außerdem kommt es oft zur konstitutiven Aktivierung bestimmter Proteine in proliferativen Signalwegen. Besonders häufig sind k-Ras oder b-Raf betroffen, welche zur Aktivierung des MAPK-Signalwegs führen, des Weiteren kommt es zu Mutationen der PI3K, wodurch der Akt-Signalweg aktiviert wird (Yuan und Cantley 2008, Jiang und Liu 2009, Souglakos *et al.* 2009, Yokota 2012). Um diese proliferativen Effekte zu unterstützen, werden außerdem Tumorsuppressoren wie Rb und p53 reprimiert. Rb als zentrales Protein im Zellzyklus entscheidet abhängig von Umgebungssignalen und dem Zustand der Zelle über das Fortschreiten des Zellzyklus, welcher ohne Rb unkontrolliert abläuft (Burkhardt und Sage 2008). p53 kontrolliert den Zellzyklus abhängig von intrazellulärem Stress und DNA-Schädigung (Junttila und Evan 2009).

Auch apoptotische Signale, welche zur Aktivierung von Caspasen und dadurch zum Abbau der Zelle führen, sind in Tumoren dereguliert. Der intrinsische Apoptoseweg wird durch die Menge an pro- und antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie reguliert, wobei Bak und BAX die Integrität der Mitochondrienmembran stören und zum Ausströmen apoptotischer Signale, allen voran Zytocrom C, aus den Mitochondrien führen. Durch diese Signale wird die Initiatorcaspase 9 aktiviert. Extrinsische Faktoren aktivieren über

Fas-Liganden und -Rezeptoren Initiatorcaspase 8. Beide Initiatorcaspasen aktivieren wiederum verschiedene Effektorcaspasen, welche durch ihre proteolytische Aktivität zum Abbau von Proteinen, Zellstrukturen und letztendlich der gesamten Zelle führen (Cotter 2009).

Replikative Unsterblichkeit erlangen Tumorzellen unter anderem durch die Fähigkeit, Telomerase zu exprimieren, wodurch Tumorzellen mehr Replikationszyklen durchlaufen können als normale Zellen, welche durch die Verkürzung der Telomere bei jedem Replikationsschritt altern und letztendlich absterben (Blasco 2005).

Um die Ernährung und Versorgung des Tumors zu gewährleisten und die stetig wachsende Zellzahl zu versorgen, müssen neue Blutgefäße gebildet werden. Unter anderem VEGF-A und TSP-1 sind induzierend bzw. inhibierend an der Angiogenese beteiligt. Dieser Prozess ist im adulten Gewebe nur nach Verletzungsprozessen aktiv und führt in Tumoren zu einer andauernden Neubildung von Blutgefäßen (Hanahan und Folkman 1996).

Invasion von Tumorzellen in gesundes Gewebe und die damit einhergehende Metastasierung werden als kaskadenartige Abfolge mehrerer Einzelschritte gesehen, welche durch zellbiologische Veränderungen initiiert werden. Diese führen zu einer lokalen Invasion mit darauffolgender Intravasation von Tumorzellen in benachbarte Blut- und Lymphgefäße. In diesen bewegen sie sich fort, um dann in entferntes Gewebe einzuwandern (Extravasation), wobei sich Mikrometastasen bilden, die in Tumoren auswachsen (Kolonialisierung) (Talmadge und Fidler 2010). Die zellbiologischen Veränderungen, die zur Intravasation nötig sind, sind vielseitig; so kommt es unter anderem zur Herunterregulation oder Inhibition von E-Cadherin (Berk und Van Roy 2009). Dies stellt einen Schritt in der EMT dar, der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition, durch welche transformierte epitheliale Zellen die Fähigkeiten erhalten, in gesundes Gewebe einzudringen und zu streuen. Des Weiteren sind Transkriptionsfaktoren wie Slug und Snail an diesem noch nicht vollständig aufgeklärten Prozess beteiligt (Polyak und Weinberg 2009).

Zwei weitere Fähigkeiten von Tumorzellen postulierten Hanahan und Weinberg 2011:

- Umprogrammierung des Energiemetabolismus
- aktives Ausweichen vor Immunzellen

Da der Energiemetabolismus in Tumorzellen auf aerobe Glykolyse umgestellt wird (Warburg-Effekt), wird zur Energiegewinnung mehr Glukose benötigt, weshalb verstärkt Glukosetransporter exprimiert werden (Warburg 1956a, 1956b). Dadurch können die

Zellen Intermediate der Glykolyse verwenden, um Nucleoside und Aminosäuren sowie Zellorganellen zu synthetisieren, ein bekanntes Prinzip bei schnell wachsenden Zellen (Vander Heiden *et al.* 2009). Des Weiteren ist es Tumorzellen scheinbar möglich, sich den Immunzellen zu entziehen, die dieser Fähigkeit zugrunde liegende Regulation ist allerdings unklar.

Um die oben beschriebenen Fähigkeiten zu erlangen, besitzen Tumoren zwei Charakteristika: genomische Instabilität und tumorpromovierende Inflammation. Durch die genomische Instabilität können Mutationen akkumulieren (Negrini *et al.* 2010). Des Weiteren sekretieren Immunzellen im Tumor Wachstums- und Überlebensfaktoren sowie angiogenetische Faktoren, welche Tumorgenese und Tumorprogression verstärken (Grivennikov *et al.* 2010).

An den verschiedenen Fähigkeiten von Tumorzellen wird deutlich, dass viele komplexe zelluläre Veränderungen bei der Tumorentstehung zusammenspielen. All diese können jedoch nutzbar gemacht werden für die Entwicklung von Antitumortheraeutika.

1.2 Therapien zur Behandlung von Tumoren

Zur Behandlung von Tumoren stehen die Möglichkeiten der Resektion, Strahlentherapie und Chemotherapie zur Verfügung. Die zur Chemotherapie verwendeten Medikamente nutzen die schnellere Replikations- und Proliferationsfähigkeit von Tumorzellen gegenüber normalen Zellen, um erstere gezielt zu treffen. Allerdings weisen sie trotzdem meist starke Nebenwirkungen auf. Meist werden verschiedene Medikamente kombiniert, um den maximalen Behandlungseffekt zu erzielen und Nebenwirkungen zu minimieren.

Beim Kolonkarzinom sind zwei klassische Therapieschemata im Einsatz, welche mit weiteren Medikamenten ergänzt werden können. Das Grundschema besteht aus Fluoruracil (5-FU) und Folinsäure. 5-FU wirkt als Antimetabolit und wird anstelle von Pyrimidinbasen in Nucleinsäuren eingebaut, zusätzlich wird die Thymidylat-Synthase gehemmt, was insgesamt zur Inhibition der Synthese von Nucleinsäuren führt. Folinsäure wirkt synergistisch zu 5-FU auf die Thymidylat-Synthase, verstärkt somit dessen Wirkung und erhöht außerdem die Verträglichkeit. Diesem Grundschema wird entweder der Topoisomerasehemmer Irinotecan zugefügt (FOLFIRI), wodurch Doppelstrangbrüche in der DNA entstehen, oder Oxaliplatin (FOLFOX), welches zur Quervernetzung der DNA führt (De Gramont *et al.* 2000, Saltz *et al.* 2000, Tournigand *et al.* 2004, Pasetto *et al.* 2005).

Die beiden Therapieschemata FOLFOX und FOLFIRI können durch weitere Medikamente ergänzt werden. So können nicht-k-Ras-mutierte Kolontumoren zusätzlich mit dem therapeutischen Antikörper Cetuximab behandelt werden, welcher EGFR bindet und somit die Ligandenbindung und das nachgeschaltete Signalleitungssystem inhibiert (Humblet 2004, Van Cutsem *et al.* 2009). Bevacizumab ist ebenfalls ein monoklonaler Antikörper, er bindet und entfernt den Wachstumsfaktor VEGF und wirkt somit als Angiogenesehemmer (Hurwitz *et al.* 2004, O'Connor *et al.* 2009).

Um die Therapiemöglichkeiten zu erweitern und zu verbessern und Nebenwirkungen für Patienten zu minimieren, wird an immer neuen und besseren Medikamenten geforscht. Im Folgenden soll auf zwei Typen von Medikamenten genauer eingegangen werden, die im Rahmen dieser Arbeit detailliert untersucht wurden: Antimitotische Substanzen und Histon-Deacetylase-Inhibitoren.

1.2.1 Antimitotische Substanzen

Antimitotische Substanzen werden schon lange als Antitumormedikamente eingesetzt. Sie wirken durch Inhibition des Auf- oder Abbaus der Mikrotubuli. Dies führt zu fehlerhafter Mitose und somit zur Zellzyklusblockade durch Aktivierung des Spindel-Kontrollpunkts SAC (*spindle assembly checkpoint*), was oft den Zelltod zur Folge hat (Jordan und Wilson 2004, Musacchio und Salmon 2007).

Ein bekannter Vertreter dieser Wirkstoffklasse ist Paclitaxel (Taxol), welches spezifisch den Abbau der Mikrotubuli inhibiert (Yvon *et al.* 1999). Allerdings zeigen Substanzen, die direkt auf Mikrotubuli wirken meist starke Nebenwirkungen. Zwar ist die Mikrotubuli-Dynamik in der Mitose im Vergleich zur Interphase stark erhöht, dennoch werden auch gesunde Zellen durch Inhibition der Mikrotubuli getroffen (Yvon *et al.* 1999). Vor allem periphere Neuropathien, welche durch Inhibition von Mikrotubuli in nicht-teilenden Zellen entstehen, stellen ein großes Problem dar (Rowinsky *et al.* 1993, Rowinsky und Donehower 1995). Um diese Nebenwirkungen zu minimieren, wurden antimitotische Substanzen entwickelt, welche nur auf Zellen in der Mitose wirken. Neben den mitotischen Kinasen Aurora und PLK1, stellt das mitotische Kinesin Eg5 ein Zielmolekül dieser Substanzen dar (Jackson *et al.* 2007).

Kinesine sind die Motorproteine der Zelle, welche unter ATP-Verbrauch entlang der Mikrotubuli Organellen, Proteinkomplexe und mRNA transportieren. Außerdem sind sie an Chromosomen- und Spindelbewegungen während der Mitose beteiligt (Miki *et al.* 2005). Das mitotische Kinesin Eg5 ist in der Mitose für die korrekte Aufteilung der Chromosomen auf die beiden Tochterzellen essentiell. Eg5 bewirkt die vollständige Separation der

Zentrosomen und somit die Ausbildung bipolarer Spindeln (Valentine *et al.* 2006, Huszar *et al.* 2009, Ferenz *et al.* 2010). Wird Eg5 beispielsweise durch Monastrol inhibiert, so werden monastrale Spindeln ausgebildet, wodurch an den Kinetochoren eine verringerte Zugspannung detektiert wird, was den Spindel-Kontrollpunkt SAC aktiviert (Mayer 1999, Kapoor *et al.* 2000). Dieser Kontrollpunkt verhindert bei inkorrekturer Spindelbindung das Fortschreiten der Mitose und arretiert die Zellen zwischen Meta- und Anaphase. Als Folge davon kommt es abhängig von Zelltyp und antimitotischer Substanz zu Zelltod oder Wiedereintritt der Zellen in die Interphase ohne erfolgte Zellteilung, was den Zelltod oder die anschließende Genomreplikation zur Folge hat (Rieder und Maiato 2004, Weaver und Cleveland 2005).

Da Eg5-Inhibitoren spezifisch auf mitotische Zellen wirken, zeigen sie deutlich schwächere Nebenwirkungen als klassische antimitotische Substanzen wie Taxol (Lee *et al.* 2008, Tang *et al.* 2008). Die Entwicklung effektiver Eg5-Inhibitoren stellt somit einen vielversprechenden Schritt für die Behandlung von Tumoren dar.

1.2.2 Histon-Deacetylase-Inhibitoren

Histon-Deacetylasen (HDAC) katalysieren die Deacetylierung der Lysinreste von Histonschwänzen. Dadurch werden die Histonschwänze positiv geladen und die Packungsdichte der Nukleosomen nimmt durch verstärkte Wechselwirkungen zwischen negativ geladenem DNA-Rückgrat und den Histonen zu. Die DNA wird somit schlechter zugänglich für Transkriptionsfaktoren und die Transkription wird reprimiert. Zusätzlich zu ihrer Aktivität gegenüber Histonen, deacetylieren HDACs weitere zelluläre Proteine.

HDACs werden in vier Klassen eingeteilt, wobei es sich bei den Klassen I, II und IV um Zn⁺-abhängige, bei Klasse III, den Sirtuinen, um NAD⁺-abhängige Enzyme handelt. HDACs der Klasse I beinhalten HDAC1, 2, 3, und 8 und werden ubiquitär exprimiert. Während die HDACs 1-3 nukleär aktiv sind, wirkt HDAC8 auch zytosolisch. Neben Histonen sind unter anderem p53, Rb und STAT3 Substrate von HDAC1-3 (Witt *et al.* 2009). Klasse IIa beinhaltet die HDACs 4, 5, 7 und 9, Klasse IIb HDAC6 und 10. Diese treten sowohl nukleär als auch zytosolisch auf und pendeln teilweise zwischen diesen Kompartimenten, sie besitzen meist gewebsspezifische Wirkung. HDACs der Klasse IIa können durch Phosphorylierung reguliert werden und koppeln somit extrazelluläre Signale an die Transkriptionsregulation (Haberland *et al.* 2009). HDACs der Klasse IIb sind im Zytosol lokalisiert und für HDAC6 sind viele Nicht-Histonsubstrate bekannt, wie beispielsweise α -Tubulin, Transmembranproteine, HSP90 und weitere Chaperone. Durch seine Ubiquitinbindestelle kann HDAC6 ubiquitinierte Proteine direkt binden und an deren weiterer Prozessierung mitwirken (Haberland *et al.* 2009, Marks 2010, Khan und La

Thangue 2012). HDAC11, das einzige Mitglied der Klasse IV, ist in Tumoren oft überexprimiert. Die Deletion von HDAC11 führt, unter anderem in Kolontumorzelllinien, zur Inhibition der metabolischen Aktivität und zur Induktion von Apoptose. Normale Zellen werden jedoch nicht beeinflusst, weshalb HDAC11 ein interessantes Zielprotein für die Tumorforschung darstellt (Deubzer *et al.* 2012).

Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) stellen eine neue, vielversprechende Gruppe von Antitumorsubstanzen dar. Erste Anwendung finden zwei HDACi beim kutanen T-Zelllymphom: Vorinostat (Zolinza, MSD, Whitehouse Station, NJ, USA; auch bekannt als Suberoylanilid Hydroxamsäure (SAHA)) und Romidepsin (Istodax, Celgene, Summit, NJ, USA; auch bekannt als Depsipeptid oder FK228) (Khan *et al.* 2008, Khan und La Thangue 2012).

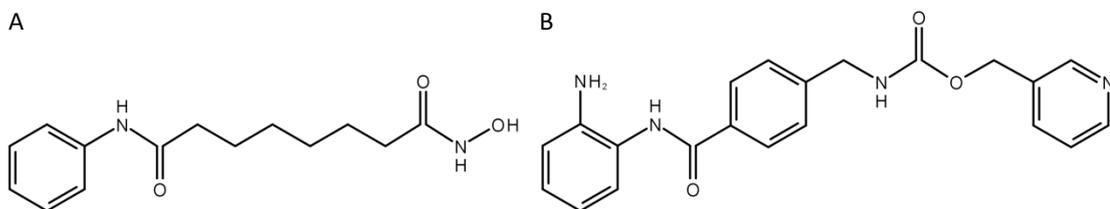


Abbildung 2: Strukturformeln zweier Histon-Deacetylase-Inhibitoren

A) zeigt die Struktur der Hydroxamsäure Vorinostat, in B) ist die des Benzamid-Analogons Entinostat dargestellt.

Histon-Deacetylase-Inhibitoren können in verschiedene strukturelle Klassen eingeteilt werden: kurzkettige Fettsäuren, Hydroxamsäuren, Benzamide, zyklische Tetrapeptide und aliphatische Säuren.

Hydroxamsäuren binden die katalytische Tasche der HDACs mit ihrem langen aliphatischen Schwanz, während das katalytisch essentielle Zink durch die polare Hydroxamatgruppe chelatiert wird (Lindemann *et al.* 2004). Die genaue Interaktion von Benzamiden mit dem aktiven Zentrum der Enzyme bleibt zu klären (Mai *et al.*, 2005).

Die Strukturformel zweier prominenter Vertreter dieser Klassen von HDACi, Vorinostat und Entinostat, sind in Abbildung 2 dargestellt (Richon 2006, Hess-Stumpp *et al.* 2007, Marks und Breslow 2007, Knipstein und Gore 2011). Während es sich bei den Hydroxamsäuren (z. B. Vorinostat) um Pan-HDACi handelt, sind Benzamide wie Entinostat meist Klasse I-spezifisch (Khan *et al.* 2008).

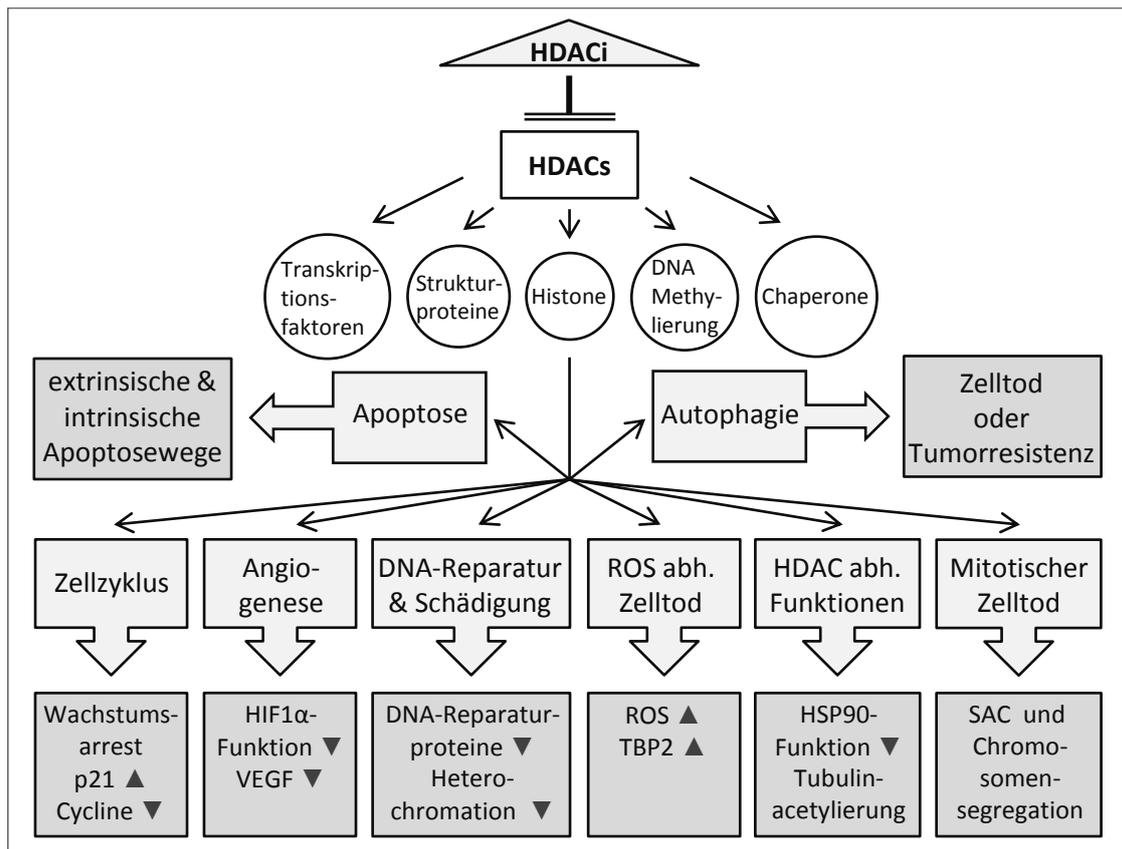


Abbildung 3: Effekte von Histon-Deacetylase-Inhibitoren auf Tumorzellen

Inhibition von Histon-Deacetylasen (HDAC) bewirkt nicht nur die Acetylierung von Histonen, auch andere Proteine werden verstärkt acetyliert. In welcher Weise Veränderungen des Acetylierungsstatus durch Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) die Zelle beeinflussen, ist hier dargestellt. Abbildung modifiziert nach Khan und La Thangue (2012).

Abkürzungen: ROS – reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*), SAC - Spindel-Kontrollpunkt (*spindle assembly checkpoint*)

Die niedermolekularen HDACi induzieren in Tumorzellen ein breites Spektrum an Reaktionen: Zellzyklusarrest, Apoptoseinduktion, Zelldifferenzierung, Autophagie und antiangiogenetische Effekte (Abbildung 3). Die Genexpression wird durch HDACi jedoch nur minimal beeinflusst, so änderte sich die Expression bei nur 5-10 % aller untersuchten Gene nach Behandlung mit HDACi (Peart *et al.* 2005). Dies deutet darauf hin, dass die Hauptwirkung von HDACi nicht auf mRNA-Ebene auftritt. Die grundlegenden Mechanismen ihrer Antitumorwirkung sind jedoch weitestgehend ungeklärt. Bekannt ist eine HDACi-abhängige Induktion von p21, wodurch ein Zellzyklusarrest ausgelöst wird; des Weiteren werden Cycline herunterreguliert (Marks 2010, Khan und La Thangue 2012). Da die meisten Tumorzellen im Gegensatz zu normalen Zellen kein funktionsfähiges p53 oder Rb und damit keinen funktionellen G1/S-DNA-Schädigungs-Kontrollpunkt besitzen, kommt es durch Induktion von p21 in Tumorzellen zu einem abweichenden Zellzyklusarrest. Dies könnte zur Apoptose der Tumorzellen führen, wohingegen normale Zellen verschont bleiben (Glaser *et al.* 2003). Des Weiteren aktivieren HDACi in normalen Zellen einen G2-Kontrollpunkt, der in Tumorzellen

beschädigt ist und so zu tumorspezifischem Zelltod führt (Qiu *et al.* 2000). Außerdem werden durch HDACi in Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen verstärkt reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) gebildet, welche die Induktion des Zelltods verstärken (Fouladi 2006). Möglicherweise liegt hierin die spezifische Wirkung von HDACi auf Tumorzellen und die geringe Wechselwirkung mit gesunden Zellen begründet. Diese Eigenschaft macht HDACi zu sehr vielversprechenden Antitumorkandidaten und die detaillierte Erforschung ihrer Wirkmechanismen zu einem wichtigen Thema in der Tumorforschung.

1.3 Epigenetische Faktoren zur Regulation der Genexpression

Bei der Regulation der Genexpression spielen epigenetische Faktoren eine große Rolle. Diese Faktoren sind nicht in der DNA kodiert, können aber trotzdem über Generationen auf Tochterzellen vererbt werden. Es handelt sich dabei um kovalente Modifikationen der DNA und der DNA-assoziierten Proteine, der Histone.

DNA-Methyltransferasen bewirken beispielsweise die Methylierung der DNA an Cytidin-Basen in Cytosin-Guanosin-Nukleotid-Dimeren (CpG). Durch Bindung spezifischer Proteine an diese methylierten Cytosine kommt es zur Kondensation der betroffenen DNA-Region und somit zur Repression assoziierter Gene. Dieser Mechanismus wird beispielsweise von Tumorzellen genutzt, um Tumorsuppressorgene zu inaktivieren (Esteller 2002).

Histone werden hauptsächlich an ihren N-terminalen Schwänzen posttranslational modifiziert. Jeweils 8 Histone (je zweimal H2A, H2B, H3 und H4) bilden die Grundeinheit des Chromatins, um sie winden sich 146 Basenpaare DNA und bilden so ein Nukleosom (Luger *et al.* 1997). Durch Modifikation der N-terminalen Histonschwänze kann die Packungsdichte des Chromatins und somit die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Lysinreste verlieren durch Acetylierung ihre positive Ladung und es kommt zur Abstoßung zwischen Acetylgruppen und negativ geladenem DNA-Rückgrat, was eine verringerte Packungsdichte des Chromatins zur Folge hat. Die DNA wird somit für Transkriptionsfaktoren besser zugänglich und die betroffenen Gene werden verstärkt exprimiert (Gregory *et al.* 2001). Diese Acetylierung von Lysinresten wird durch Histon-Acetyltransferasen (HAT) vermittelt, während Histon-Deacetylasen (HDAC) für die Deacetylierung zuständig sind. Die Aktivität von HATs und HDACs wird in Komplexen mit Transkriptions- und Cofaktoren reguliert, wodurch die Enzyme zu spezifischen Zielgenen rekrutiert werden. Neben der Acetylierung an Lysin werden Histone auch durch

Methylierung und Phosphorylierung modifiziert. Zur Phosphorylierung kommt es an Serin, Threonin und Tyrosin. Methyliert werden Lysin und Arginin durch das Zusammenspiel von Histon-Methyltransferasen (HMT) mit Histon-Demethylasen (KDM), wobei jede Aminosäure mit bis zu drei Methylgruppen belegt werden kann. Der Effekt dieser Modifikationen hängt stark von der Position der modifizierten Aminosäure im Histon sowie vom betroffenen Promotor ab (Dawson und Kouzarides 2012).

Neben dem direkten Zusammenhang zwischen Histonmodifikation und DNA-Packungsdichte haben Histonmodifikationen auch indirekte, positionsspezifische Funktionen (Kouzarides 2007, Campos und Reinberg 2009). Diese werden in der Histon-Code-Hypothese beschrieben, welche den Modifikationen spezifische Funktionen zuordnet (Jenuwein und Allis 2001). Sie besagt, dass sich verschiedene Modifikationen gegenseitig beeinflussen und spezifischen Einfluss auf die Transkription haben. Bestimmte Proteine, die *Reader*, können diese Modifikationen erkennen und bilden Proteinkomplexe aus, die die Genexpression beeinflussen.

Histon H3 besitzt den längsten N-terminalen Schwanz und die spezielle Position am Nukleosom ermöglicht weitreichende Interaktionen mit der Linker-DNA, weshalb der Modifikationsstatus von Histon H3 die Chromatinstruktur besonders stark beeinflusst (Richmond *et al.* 1984, Zlatanova *et al.* 1998).

1.3.1 Phosphorylierungen von Histon H3 in der Interphase

Nach Aktivierung durch ERK1/2 und p38 MAPK bewirken die nukleären Kinasen MSK1 und MSK2 in der Interphase die Phosphorylierung von Histon H3 an Serin 10 und Serin 28 (Deak *et al.*, 1998). Als nukleosomale Antwort auf Mitogen- und Stress-Stimuli kommt es in Promotorregionen von IEGs (*immediate early genes*, unmittelbar frühe Gene), wie *c-jun* und *c-fos*, zu diesen Phosphorylierungen, was die Transkription der Gene induziert (Thomson *et al.* 1999, Soloaga *et al.* 2003). Allerdings liegen Serin 10 und Serin 28 nie gleichzeitig am selben Histon H3-Schwanz phosphoryliert vor und auch kaum an benachbarten Nukleosomen (Dyson *et al.* 2005).

Dephosphoryliert wird Histon H3 an Serin 10 durch die regulatorische Phosphatase PP2A. 14-3-3-Adaptorproteine hingegen binden doppelt modifiziertes Histon H3 (S10pK9ac oder S10pK14ac) und schützen Serin 10 dadurch vor der Dephosphorylierung. Die Acetylierung von Lysin 9 oder Lysin 14, welche durch HDACi verstärkt wird, stabilisiert somit die Phosphorylierung an Serin 10 und seine aktivierende Wirkung. Auch im Promotor des CDK-Inhibitors p21 konnten diese Modifikationen beobachtet werden, was die Induktion von p21 durch HDACi erklärt (Simboeck *et al.* 2010).

Die Phosphorylierung von Histon H3 an Threonin 11 erfolgt in der Interphase durch die Chromatin-assoziierte Kinase Chk1 und hat die Transkription zellzyklusregulatorischer Gene wie z. B. *cdk1* zur Folge. Nach DNA-Schädigung wird Chk1 durch ATR phosphoryliert, dissoziiert vom Chromatin und es kommt zur transkriptionellen Repression. Die reprimierte Expression von CDK1 aktiviert wiederum PP1 γ , welche die Phosphorylierung an Threonin 11 weiter verringert (Shimada *et al.* 2008, 2010).

1.3.2 Phosphorylierungen von Histon H3 in der Mitose

In der Mitose spielen die Phosphorylierungen von Histon H3 an Serin 10 und Serin 28 eine wichtige Rolle bei der Chromatinkondensation und der damit assoziierten Transkriptionsrepression (Gurley *et al.* 1978). In der Interphase induzieren sie hingegen die Transkription von IEGs, wie *c-jun* und *c-fos* (Clayton *et al.* 2000). Somit besitzen diese Phosphorylierungen stark kontextspezifische Funktionen. Wahrscheinlich bestimmt der Grad der Chromatinphosphorylierung, welcher während der Mitose erheblich größer ist als in der Interphase, die Auswirkung auf die Transkription (Sawicka und Seiser 2012).

Während der Mitose verhalten sich die Phosphorylierungen an Serin 10 und Serin 28 sehr ähnlich in ihrer zeitlichen und örtlichen Abfolge und treten gleichzeitig mit der Chromosomenkondensation auf. Die Phosphorylierung an Serin 10 ist für die Initiation der Chromosomenkondensation essentiell, nicht jedoch für deren Andauern (Van Hooser *et al.* 1998). Durch Aurora B phosphoryliert, steigt der Phosphorylierungsgrad von Serin 10 und Serin 28 mit Beginn der G2-Phase an perizentromerem Heterochromatin an und breitet sich über die gesamten Chromosomenarme aus. In der Metaphase wird die maximale Phosphorylierung erreicht, gefolgt von einer rapiden Abnahme bis hin zur frühen Telophase, wobei die Phosphorylierung an Serin 10 zuerst ansteigt, während die an Serin 28 wiederum zuerst abfällt (Hendzel *et al.* 1997, Hsu *et al.* 2000, Giet und Glover 2001, Goto *et al.* 2002, McManus und Hendzel 2006). Nach der Trennung der Chromosomen dissoziiert Aurora B, außerdem kommt es durch PP1 zur Dephosphorylierung. PP1 hält auch außerhalb der Mitose die Phosphorylierung von Serin 28 auf einem undetektierbaren Niveau (Goto *et al.* 2002). Durch eine inhibierende Phosphorylierung an Threonin 320 wird die Aktivität von PP1 während der Mitose reprimiert (Kwon *et al.* 1997).

Die Phosphorylierung von Histon H3 an Threonin 11 in der Mitose unterscheidet sich örtlich und zeitlich von der an Serin 10 und Serin 28 und tritt, beginnend in der Prophase, bis zur frühen Anaphase hin vor allem in zentromeren Regionen auf (Preuss *et al.* 2003). Die Phosphorylierung der Serine beginnt hingegen früher, dauert länger an und liegt vor allem auf den Chromosomenarmen vor (Hendzel *et al.* 1997, McManus und Hendzel

2006). Als Kinase von Histon H3 an Threonin 11 wurde DAPK3 identifiziert, eine ubiquitär vorkommende nukleäre Kinase, welche von der Prophase bis zur Anaphase an den Zentromeren lokalisiert ist (Preuss *et al.* 2003). Zhou *et al.* (2008 a) postulierten, die Phosphorylierung von Threonin 11 könnte als Erkennungscode für den Kinetochor-Aufbau und als Kontrollpunkt zwischen Metaphase und Anaphase dienen.

1.4 Sphäroide zur Testung der Wirksamkeit von Antitumorsubstanzen

Die präklinische Testung von Antitumorsubstanzen beruht hauptsächlich auf zweidimensionalen Zellkulturmodellen. Allerdings sind diese weit entfernt von der klinischen Situation im Patienten und stellen oft nur relativ schlechte Prädiktoren für die Wirksamkeit von Substanzen dar (Kunz-Schughart *et al.* 2004). Dies spiegelt sich besonders deutlich in der hohen Durchfallrate von Wirkstoffkandidaten in klinischen Studien wider, welche in der Onkologie bei 95 % liegt (Collins und Workman 2006).

Vor allem das Tumor-Mikromilieu, welches durch die extrazelluläre Matrix, Stromazellen und die dreidimensionale Zellarchitektur entsteht, fehlt im zweidimensionalen Zellkulturmodell vollständig (Mueller und Fusenig 2004). Letztendlich liegt hierin auch teilweise das Problem bei der Verwendung von Xenograft-Modellen, da das Mikromilieu murinen Ursprungs ist, außerdem ist die subkutane Lokalisation des Tumors äußerst artifiziell (Kelland 2004, Teicher 2006). Um die Effizienz der Wirkstoffentwicklung zu erhöhen, sind daher neue Modelle nötig, welche das Tumor-Mikromilieu einbeziehen, um bereits in der präklinischen Phase die Wirksamkeit neuer Wirkstoffkandidaten aussagekräftig vorherzusagen.

Bereits in den 1940er Jahren wurden erste grundlegende Versuche mit dreidimensionalen Zellclustern durchgeführt und in den 1970er Jahren wurden Sphäroide erstmals als *in vitro*-Modelle für die Tumorthherapie eingesetzt (Holtfreter 1944, Moscona und Moscona 1952, Sutherland *et al.* 1970). Die Methoden zur Herstellung von Sphäroiden haben sich zwischenzeitlich nur wenig geändert und beruhen auf dem Prinzip, den Zellen keine Adhäsionsfläche zu bieten und sie so zur Aggregation zu zwingen. Um Sphäroide im großen Ansatz herzustellen, werden Spinnerflaschen verwendet, in welchen durch ständiges Rühren ein Anheften der Zellen verhindert wird; demselben Prinzip unterliegen Rollerflaschen (Sutherland *et al.* 1970). Beim *Liquid-Overlay*-Verfahren werden Zellkulturplatten mit Agarose beschichtet um die Anheftung der Zellen an der Platte zu unterbinden (Carlsson und Yuhas 1984). Diese Methode kann auch in Mikrotiterplatten angewendet werden und eignet sich besonders, um einzelne Sphäroide für die

Behandlung mit Wirkstoffen zu generieren. Die Technik des hängenden Tropfens (*hanging drop*) erzeugt einzelne Sphäroide in kleinen Tröpfchen, die an der Unterseite von Zellkulturplatten hängen, kann aber nur zur kurzfristigen Sphäroidgenerierung eingesetzt werden und ist ungeeignet für die Behandlung mit Substanzen (Kelm *et al.* 2003).

Dreidimensionale Tumorsphäroide spiegeln viele Eigenschaften humaner Mikrotumoren wider, da sie Mikromilieu, Zellarchitektur und Interaktionen zwischen Tumorzellen imitieren. Durch ihre dreidimensionale Struktur entsteht eine differenzierte Tumorarchitektur mit unterschiedlichen Zelleigenschaften. So entsteht im Sphäroid, ähnlich wie im avaskulären Mikrotumor, ein Gradient von Sauerstoff und Nährstoffen, was dazu führt, dass die Zellen im Sphäroidinneren, abhängig von der Sphäroidgröße nekrotische Eigenschaften zeigen, wohingegen die Proliferation zum Sphäroidäußeren hin zunimmt (Friedrich *et al.* 2007a, Lin *et al.* 2008).

Im Vergleich mit zweidimensionalen Monolayerzellen wurde in verschiedenen Zellsystemen (MCF-7 Mammakarzinomzellen; HT-29, HCT-116 und DLD-1 Kolonkarzinomzellen) mit unterschiedlichen Wirkstoffen (Paclitaxel, 5-FU, Irinotecan) gezeigt, dass Sphäroide resistenter gegenüber Wirkstoffbehandlungen sind und die IC_{50} -Werte denen in der klinischen Situation mehr entsprechen (Nicholson *et al.* 1997, Mellor *et al.* 2005, Zhang *et al.* 2005, Friedrich *et al.* 2007b). Des Weiteren können Unterschiede in der Genexpression zwischen Sphäroiden und Monolayerzellen detektiert werden, wobei die Genexpression in Sphäroiden eher der des nativen Gewebes entspricht (Lawlor *et al.* 2002, Gaedtke *et al.* 2007, Chang und Hughes-Fulford 2009). Um der *in vivo*-Situation noch näher zu kommen, können neben Zelllinien auch primäre Tumorzellen, beispielsweise aus Biopsien, zur Sphäroidgenerierung eingesetzt werden. Dadurch wird die *ex vivo*-Behandlung von Tumoren ermöglicht, was eine Vorselektion von aussichtsreichen Medikamenten vor Therapiebeginn möglich macht.

Sphäroide bieten somit die Möglichkeit, bereits in der präklinischen Forschung mit einem tumornahen System zu arbeiten und ermöglichen eine umfangreiche Wirkstoffcharakterisierung bereits in den frühen Phasen der Medikamentenentwicklung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sphäroidtechnologie mit Protein-Mikroarrays kombiniert, um ausführliche Wirkprofile von neuen Antitumorsubstanzen zu generieren.

1.5 Protein-Mikroarrays

Mikroarrays spielen seit den 1990er Jahren eine stetig wachsende Rolle in der biochemischen Forschung. Sie zeichnen sich vor allem durch hohe Parallelisierbarkeit und einen minimalen Probenverbrauch aus. Dadurch werden Experimente beschleunigt und die Analysen großer Probenmengen ermöglicht. Protein-Mikroarrays eignen sich somit bestens für systembiologische Ansätze. Die Miniaturisierung des Systems bedingt außerdem, nach Roger Ekins *ambient analyte assay*-Theorie (Ekins 1989, Ekins und Chu 1991), eine hohe Sensitivität: Da die Fängermoleküle im Mikrospot in hoher Dichte auf einer sehr geringen Fläche immobilisiert sind, ist die lokale Signalintensität sehr groß, wodurch mit wenigen Analyten ein hohes Signal generiert wird. Außerdem ändert sich die Konzentration der Analyten in Lösung durch Bindung an die wenigen Fängermoleküle nur unwesentlich, wodurch Mikroarrays von Probenvolumen und Antikörperkonzentration unabhängig sind und auch sehr geringe Analytmengen detektiert werden können.

Bei DNA-Mikroarrays werden chemisch synthetisierbare Oligonukleotide auf einer festen Phase immobilisiert. Somit kann die Proteinexpression auf mRNA-Ebene untersucht werden (Schna *et al.* 1995). Aufgrund der problemlosen Replizierbarkeit der Fängermoleküle mittels chemischer Synthese, ist diese Art von Mikroarrays weit verbreitet. Im Gegensatz dazu werden für Protein-Mikroarrays meist Antikörper als Fängermoleküle benötigt. Diese können nicht synthetisiert werden, sondern müssen aufwändig generiert werden. Außerdem gibt es starke Unterschiede in der Spezifität der Antikörper-Antigen-Bindung, weshalb die Qualität der Antikörper einen essentiellen und limitierenden Faktor bei Protein-Mikroarrays darstellt. Ein deutlicher Vorteil besteht jedoch darin, dass die Analyse direkt auf Proteinebene stattfindet. Somit können auch Protein-Isoformen und Proteinmodifikationen detektiert werden und die Ergebnisse werden nicht durch Differenzen zwischen mRNA- und Proteinniveau verfälscht (Gygi *et al.* 1999, Templin *et al.* 2002, Stoll *et al.* 2005). Neben Protein-Mikroarrays stellt die Massenspektrometrie (MS) eine Standardmethode zur Proteinanalyse dar. Durch MS-Analysen können wenige Proben ausgiebig auf ihren Proteinexpressions- und -modifikationsgrad untersucht werden. Somit können ohne Vorwissen im Schrotschuss-Verfahren große Datenmengen generiert werden. Im Gegensatz zum zielgerichteten Protein-Mikroarray ist der Probenverbrauch aber sehr groß und die Vermessung vieler Proben kostspielig. Außerdem werden vorrangig diejenigen Proteine detektiert, die in großer Zahl vorkommen. Durch verschiedene Methoden ist es zwar möglich, weniger häufig vorkommende Proteine anzureichern und somit der MS-Analyse zugänglich zu machen, dieser Schritt birgt aber immer die Gefahr, Informationen zu verlieren (Gygi *et al.* 2000, Hoeppe *et al.* 2011).

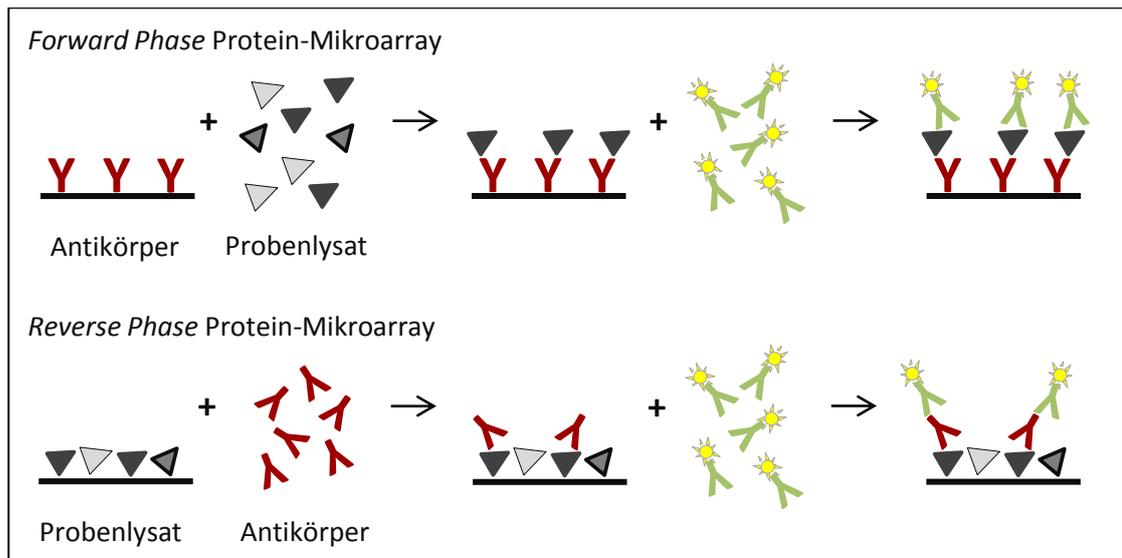


Abbildung 4: Vergleich der Formate von Protein-Mikroarrays

Der *Forward Phase* Protein-Mikroarray entspricht einem miniaturisierten ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*): Spezifische Antikörper werden auf der festen Phase immobilisiert und mit Probenlysat inkubiert. Beim *Reverse Phase* Protein-Mikroarray wird hingegen das Probenlysat auf der festen Phase immobilisiert und mit Antikörpern inkubiert; diese entspricht somit einem miniaturisierten Dot Blot. Die Detektion erfolgt jeweils über fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper. Abbildung modifiziert nach Kramer (2006).

Bei Protein-Mikroarrays können zwei Varianten unterschieden werden, der *Forward Phase* Protein-Mikroarray, bei dem die Fängermoleküle, also Antikörper, auf der festen Phase immobilisiert werden und der *Reverse Phase* Protein-Mikroarray (RPPA), bei dem die Probenlysate immobilisiert werden. Als feste Phase dienen, je nach verwendeter Technologie, planare Glasobjektträger oder Mikrosphären. In Abbildung 4 sind die beiden Varianten des Protein-Mikroarrays dargestellt.

Der *Forward Phase* Protein-Mikroarray entspricht einem miniaturisierten ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*; Engvall und Perlmann 1971), hierbei werden spezifische Antikörper auf einer festen Phase immobilisiert und mit den zu analysierenden Proben inkubiert, detektiert wird mit einem spezifischen Zweitantikörper. Somit entsteht ein *Sandwich*-Immunoassay, welcher sich durch eine besonders hohe Spezifität auszeichnet, da jeder Analyt durch zwei unabhängige Antikörper gebunden werden muss um ein Signal zu generieren (Nielsen *et al.* 2003). Allerdings werden dadurch pro Analyt zwei spezifische Antikörper mit verschiedenen Epitopen benötigt, was einen limitierenden Faktor darstellt. Bei einer anderen Variante des *Forward Phase* Protein-Mikroarrays wird die Probe direkt fluoreszenzmarkiert, wodurch kein zweiter spezifischer Antikörper benötigt wird (Haab *et al.* 2001). Allerdings muss dabei eine gleichmäßige Markierung der Moleküle gewährleistet werden.

Beim *Reverse Phase* Protein-Mikroarray wird die Probe direkt auf der festen Phase immobilisiert, sodass ein spezifischer Antikörper zur Detektion ausreicht; diese Variante

des Protein-Mikroarrays entspricht somit einem miniaturisierten Dot Blot (Paweletz *et al.* 2001). Prinzipiell werden beim *Reverse Phase* Protein-Mikroarray einzelne Analyten parallel in einer Vielzahl von Proben analysiert, während beim *Forward Phase* Protein-Mikroarray parallel viele Analyten in einer einzelnen Probe untersucht werden. Die Detektion erfolgt in beiden Fällen meist durch Fluoreszenz. Hierfür wird entweder der Detektionsantikörper direkt fluoreszenzmarkiert oder ein weiterer speziesspezifischer fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper eingesetzt.

1.5.1 Reverse Phase Protein-Mikroarrays

Beim *Reverse Phase* Protein-Mikroarray (RPPA) wird ein minimales Volumen eines komplexen Proteinextrakts in Mikrosots auf einer hydrophoben Oberfläche immobilisiert. Das System eignet sich besonders zur vergleichenden Analyse von Proteinexpression und -modifikation zwischen verschiedenen Proben. Als Probenmaterial kann neben Zellkulturmaterial auch gefrorenes oder Paraffin-eingebettetes Gewebe verwendet werden, wobei Tumor- versus Normalgewebe oder verschiedene Behandlungen verglichen werden (Pirnia *et al.* 2009, Braeuning *et al.* 2011).

Durch Verwendung eines denaturierenden Lysepuffers wird gewährleistet, dass sich der Proteinstatus nach Probengenerierung nicht mehr verändert. Zur Immobilisation der Proben werden meist kontaktlose piezoelektrische Mikroarrayer verwendet, welche sich durch eine besonders hohe Präzision und gute Reproduzierbarkeit auszeichnen. Zur Immobilisation der Proben wird als hydrophobe Oberfläche oft Nitrozellulose verwendet, welche jedoch einen relativ hohen intrinsischen Hintergrund und teils Inhomogenitäten bei der Proteinadsorption zeigt. Ein kommerzielles System, welches diese Probleme umgeht ist die ZeptoMARK Technologie (Bayer Technology Services, Leverkusen). Dieses System beruht auf der Technologie des planaren Wellenleiters (PWG, *planar waveguide*) und verwendet mit Tantalpentoxid beschichtete Glasobjektträger, an die Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen zu selbstausgerichteten Alkylphosphaten binden können (Duveneck *et al.* 1997, Textor *et al.* 2000). An den Längsseiten dieser Mikroarray-Chips sind Beugungsgitter eingätzt, durch welche ein Laserstrahl (635 nm oder 532 nm) in die hochbrechende, 150 nm dünne Schicht aus Tantalpentoxid eingekoppelt werden kann. So entsteht ein evaneszentes Anregungsfeld, welches nur ca. 100 nm in die Lösung über dem Mikroarray-Chip hineinragt. Fluorophore, die sich innerhalb dieses Feldes befinden, werden angeregt und tragen so zum Gesamtsignal bei, welches über eine CCD-Kamera detektiert wird. Durch das schmale evaneszente Feld werden nur Fluorophore angeregt, welche direkt über Antikörper an die immobilisierten Proteine gebunden sind. Fluorophore in Lösung befinden sich außerhalb des Feldes und tragen nicht zum Gesamtsignal bei,

was ein vorteilhaft großes Signal-Rausch-Verhältnis bewirkt (Pawlak *et al.* 2002a, 2002b, Voshol *et al.* 2009).

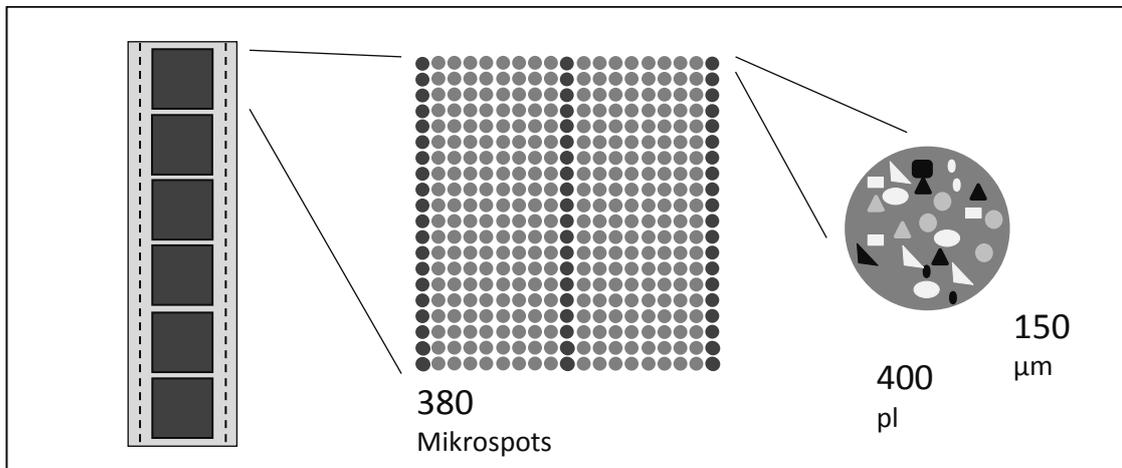


Abbildung 5: Darstellung eines Mikroarray-Chips

Jeder Mikroarray-Chip besteht aus sechs Subarrays auf welchen die denaturierend lysierten Zelllysate immobilisiert sind. An den Rändern der Mikroarray-Chips sind Beugungsgitter eingätzt, durch welche der Laserstrahl eingekoppelt wird, wodurch an der Chipoberfläche ein evaneszentes Anregungsfeld entsteht. Jeder Subarray besteht aus 380 Mikrosports mit einem Durchmesser von ca. 150 µm. Drei Spalten dienen der Referenzierung, hier wird fluoreszenzmarkiertes BSA (Rinderserumalbumin) immobilisiert. Im Mikrosport ist in einem Probenvolumen von ca. 400 pl das komplexe Proteingemisch immobilisiert.

Die Mikrosports mit einem Volumen von ca. 400 pl und einem Durchmesser von ca. 150 µm sind auf dem Mikroarray-Chip in sechs Subarrays von je 5 x 7 mm Größe immobilisiert (Abbildung 5). Diese bestehen aus je 380 Mikrosports, die in 19 Spalten und 20 Zeilen angeordnet sind. Jede Probe kann in Replikaten und variierenden Konzentrationen immobilisiert werden, wobei die Belegung je nach Anzahl der Proben variiert. Spalte 1, 10 und 19 bestehen aus fluoreszenzmarkiertem BSA (Rinderserumalbumin), welches zur Referenzierung dient. Da der Laserstrahl ins Beugungsgitter links der Proben eingekoppelt wird, breitet sich das evaneszente Feld von links nach rechts über dem Subarray aus, dies führt zu einer Abnahme der Anregungsstärke in dieser Richtung. Durch die Referenzproben können solche Feldinhomogenitäten korrigiert werden.

1.5.2 Mikrosphärenbasierte Protein-Mikroarrays

Während die Probenidentifikation beim planaren Mikroarray durch die x-y-Koordinate und somit die Position innerhalb des Mikroarrays gegeben ist, werden die Proben beim mikrosphärenbasierten Mikroarray auf farblich markierten Mikrosphären immobilisiert. Die in dieser Arbeit verwendete xMAP-Technologie der Firma Luminex (Austin, TX, USA) stellt 500 farblich differenzierbare Mikrosphären bereit. Diese 5,6 µm großen

Mikrosphären aus Polystyrol können durch unterschiedliche Kombinationen von drei Fluoreszenzfarbstoffen im Auslesegerät unterschieden werden. Auf den Mikrosphären können verschiedene Mikroarrayformate realisiert werden, wobei die Komponenten über Aktivester kovalent an Carboxylgruppen der Mikrosphärenoberfläche gebunden werden. In dieser Arbeit wurden Peptide auf den Mikrosphären immobilisiert, welche direkt mit Antikörpern gefangen wurden. Die Detektion erfolgt über speziesspezifische, Phycoerythrin-markierte Sekundärantikörper. Ein Signal wird vom Auslesegerät dann detektiert, wenn neben dem mikrosphärenspezifischen Fluoreszenzsignal auch ein Signal des Phycoerythrins detektiert wird.

2. Zielsetzung

Die Therapie hochkomplexer Tumorerkrankungen stellt die Medikamentenentwicklung vor eine große Herausforderung. Dies zeigt sich besonders deutlich an den geringen Erfolgsraten klinischer Studien in der Onkologie.

Oft werden erst in späten Phasen der Medikamentenentwicklung, zusätzlich zum eigentlichen Angriffsziel, sekundäre Wirkmechanismen und Zielproteine bekannt. Im schlimmsten Fall können diese schwere Nebenwirkungen und somit den Abbruch der Medikamentenentwicklung zur Folge haben. Aus diesem Grund sollten die Wirkprofile neuer Medikamentenkandidaten bereits in frühen präklinischen Phasen ausführlich charakterisiert werden. Hierfür eignen sich komplexe Aktivitätsanalysen von Signalwegproteinen mittels Protein-Mikroarrays.

In dieser Arbeit wurden *Reverse Phase* Protein-Mikroarrays eingesetzt, um die Wirkmechanismen proprietärer Antitumorsubstanzen auf *in vitro* generierten Tumorsphäroiden zu analysieren. Mit ihrer dreidimensionalen Struktur imitieren Tumorsphäroide Mikrotumoren im Patienten, wodurch das System der klinischen Situation nahekommt und die Analyse von Wirkstoffkandidaten auf tumornahem Material ermöglicht wird.

Die analytische Methode des *Reverse Phase* Protein-Mikroarrays sollte an die nur wenige tausend Zellen großen Sphäroide angepasst werden. Neben Zellliniensphäroiden aus HT-29 und NCCIT sollten Sphäroide aus primärem Patientenmaterial der Analyse zugänglich gemacht werden. Über 200 Assaysysteme sollten etabliert werden, um die komplexen Wirkmechanismen der Medikamentenkandidaten zu analysieren. Ein Kinesin-Inhibitor, welcher das mitotische Kinesin Eg5 hemmt, sowie zwei Klassen von Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) sollten analysiert werden: ein Pan-HDACi sowie ein Klasse I-spezifischer HDACi. Da ein Fokus der Proteinanalyse Histonmodifikationen galt, sollte ein Mikroarray-basiertes Testsystem für die Analyse der Bindecharakteristika von Anti-Histon-Antikörpern etabliert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Verwendung	Produkt	Lieferant
Durchlaufkühler	Ministat 125 cc2; Multistar	Huber Kältemaschinenbau, Offenburg; Fryka, Esslingen
Dokumentation Western Blot	ODYSSEY Infrared Imaging System; ImageQuant LAS 4000 mini	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA; GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Gelelektrophorese- System	XCell SureLock Mini-Cell	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Gefriertrockner	Alpha 2-4	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode
Heizblock	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
<i>Laminar-Flow</i> Werkbank	KVF 6.18	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen
Luftbefeuchter	B250	Brune Luftbefeuchtung Proklima, Aglasterhausen
Mikroarrayer	Nanoplotter NP2	GeSiM, Großberkmannsdorf
Mikroarray- Auslesegerät	ZeptoREADER F3000	Bayer Technology Services, Leverkusen
Mikroarray- Blockierstation	ZeptoFOG	Bayer Technology Services, Leverkusen
Mikroarray- Inkubationsvorrichtung	ZeptoCARRIER	Bayer Technology Services, Leverkusen
Mikrosphären- Auslesegerät	FLEXMAP 3D	Luminex, Austin, TX, USA
Orbitalschüttler	KL-2	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Pipetten	PIPETMAN Neo	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettier-Roboter	Genesis RSP 100	Tecan, Männedorf, Schweiz
Pipettier-Roboter mit 96-er Magnetkopf	KingFisher96	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
pH-Meter	pH-Meter 766	Knick, Berlin
Reaktionsgefäßeschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseranlage	arium 61316	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Schüttler	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Spannungsquelle	Power Ease 500	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Spektrometer	Fluostar OPTIMA	BMG Labtech, Offenburg

Verwendung	Produkt	Lieferant
Mikroarray-Steckgehäuse	ZeptoFOG Chip Rack	Bayer Technology Services, Leverkusen
Taumelroller	RM5	Assistent, Sondheim
Ultraschallbad	RK 31	Bandelin, Berlin
Vakuum-Absaugstation	LABPORT	KNF Neuberger, Freiburg
Vakuum-rotationsverdampfer	BaVaCo-M Mini-30	Bachofer, Reutlingen
Waage	Explorer E12140	OHAUS, Pine Brook, NJ, USA
Wärmeschrank	BF115	Binder, Tuttlingen
Wasserbad	GFL 1083	GFL, Burgwedel
Western Blot-System	XCell II Blot Module	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Zentrifugen	5415D und 5417R; Universal 30F	Eppendorf, Hamburg; Hettich, Tuttlingen

3.1.2 Software

Verwendung	Produkt	Lieferant
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop CS2; ImageJ 1.37v	Adobe Systems, San Jose, CA, USA; NIH, Bethesda, MD, USA
Clusteranalyse und statistische Datenanalyse	MeV Version 4.8.1, TM4 Microarray Software Suite	Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA
Datenanalyse allgemein	Excel 2003 und 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA
Mikroarrayauswertung	ZeptoVIEW 2.0 und 3.1	Bayer Technology Services, Leverkusen

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Verwendung	Produkt	Lieferant
Filtereinheiten	Ultrafree-MC Durapore 0,65 µm und 0,22 µm	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Filterpapier	Whatman chromatography paper 3 mm	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Membranfilter	Millex-SV PVDF 5 µm	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Mikroarray-Chip	ZeptoMARK protein microarray chip	Bayer Technology Services, Leverkusen
Mikrosphären	MagPlex Microspheres	Luminex, Austin, TX, USA
Mikrotiterplatten	96 und 384 Kavitäten	Greiner Bio-One, Frickenhausen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Polyacrylamid-Gele	NuPAGE Novex 4 – 12 % Bis-Tris Gels 1,0 mm 17 Well und 2D Well	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Nitrozellulose-Membran	Protran 0,2 µm	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Wassersensitives Papier	WSP	Quantifoil Instruments, Jena
Plastikwaren		Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf; Greiner Bio-One, Frickenhausen; Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA; neoLab, Heidelberg; Starlab, Hamburg; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

3.1.4 Puffer und Reagenzien

Benennung	Produkt/Zusammensetzung	Lieferant
Antioxidanzmittel	NuPAGE Antioxidant	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Assaypuffer	Zeptosens Reverse Array Assay Buffer CAB1 based on BSA	Bayer Technology Services, Leverkusen
Blockierreagenz BSA-haltig	Zeptosens Reverse Array Blocking Buffer BB1	Bayer Technology Services, Leverkusen
Blockierreagenz nicht-proteinhaltig	StabilGuard Immunoassay Stabilizer (BSA-frei)	Diarect, Freiburg
Bradford Reagenz	Pierce Coomassie Assay Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DMEM Medium	DMEM high glucose (4,5 g/l)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Druckpuffer	CLB2 (CLB1 : CSBL1 = 1 : 10)	
Dulbecco's PBS		PAA Laboratories, Pasching, Österreich
ECL Entwicklungs- reagenz	SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Benennung	Produkt/Zusammensetzung	Lieferant
FKS		PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glutamin		PAA Laboratories, Pasching, Österreich
HBSS		PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Labelingpuffer	50 mM NaHCO ₃ 0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS pH 9,3	
Laufpuffer	NuPAGE MES SDS Running Buffer	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
LDS-Probenpuffer	NuPAGE LDS Sample Buffer	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Lowry Reagenz	DC Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Lysepuffer denaturierend	Zeptosens Reverse Array Lysis Buffer CLB1	Bayer Technology Services, Leverkusen
Lysepuffer nativ	150 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 50 mM Tris 1 % (v/v) Triton X-100 1 x cOmplete Proteaseinhibitor 1 x Phosphataseinhibitor I und II Benzonase in H ₂ Odd pH 7,4	
PBS (für RPPA)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM NaH ₂ PO ₄ in H ₂ Odd pH 7,0	
PBST	0,05 % (v/v) Tween 20 in Dulbecco's PBS	
Ponceau S-Lösung	0,1 % (w/v) Ponceau S in 5 % Essigsäure in H ₂ Odd	
Probenpuffer	NuPAGE LDS Samplebuffer	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Protein- Größenstandard	Odyssey Protein Molecular Weight Marker; SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Reduktionsmittel	NuPAGE Sample Reducing Agent	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Streptavidin-PE	Streptavidin-R-Phycoerythrin	ProZyme, Hayward, CA, USA
TBS	10 mM Tris 150 mM NaCl in H ₂ Odd pH 7,4	
TBST	0,1 % (v/v) Tween 20 in TBS	
Transferpuffer	NuPAGE Transfer Buffer	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

Benennung	Produkt/Zusammensetzung	Lieferant
Verdünnungspuffer	Zeptosens Reverse Array Spotting Buffer CSBL1	Bayer Technology Services, Leverkusen

3.1.5 Chemikalien

Produkt	Lieferant
Benzonase Nuklease	Merck, Darmstadt
BSA Albumin Fraktion V (Protease-frei)	Carl Roth, Karlsruhe
Colcemid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
cOmplete EDTA-frei Proteaseinhibitor-Cocktail Tabletten	Roche Diagnostics, Risch, Schweiz
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
KCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth, Karlsruhe
NaH ₂ PO ₄	Carl Roth, Karlsruhe
NHS-Alexa647 Alexa Fluor 647 Protein Labeling Kit und Alexa Fluor 647 Succinimidyl Ester	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Paclitaxel	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phosphataseinhibitor I und II	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween 20	Merck, Darmstadt

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen. Alle Chemikalien hatten jeweils den höchsten erhältlichen Reinheitsgrad.

3.1.6 Antikörper

Beim *Reverse Phase* Protein-Mikroarray (RPPA) kommt es, im Gegensatz zum Western Blot, nicht zur größenspezifischen Auftrennung des Probenlysats und man erhält ein Summensignal aller vom Primärantikörper gebundenen Proteine. Aus diesem Grund wurde die Spezifität der im RPPA eingesetzten Antikörper mittels Western Blot auf relevantem Material untersucht (3.2.8). Antikörper gegen modifizierte Histone wurden zusätzlich mittels Peptidarray charakterisiert (4.3.3.1). Alle in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper können der Liste im Anhang entnommen werden (Tabelle 20). Dort sind auch die eingesetzten Verdünnungen, sowie die Ergebnisse der Antikörpercharakterisierung vermerkt.

Tabelle 1: Detektionsantikörper

Abkürzungen: Sz – Antikörperspezies, Verd. – Verdünnung, rb – Kaninchen (*rabbit*), dk – Esel (*donkey*), ms – Maus, gt – Ziege (*goat*), rt – Ratte, PE – Phycoerythrin, HRP – Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*), PA - Peptidarray, WB - Western Blot, RPPA – *Reverse Phase* Protein-Mikroarray, Herst. – Hersteller, Verd. – Verdünnung

Antigen	Sz	Konjugation	Hersteller	Anwendung	Verd.
rb-IgG (H+L)	dk	PE	Dianova, Hamburg	PA	200
ms-IgG (H+L)	gt	PE	Dianova, Hamburg	PA	200
c-Myc	ms	PE	NMI, Reutlingen	PA	87
rb-IgG (H+L)	dk	IRDye 800CW	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA	WB	10000
ms-IgG (H+L)	dk	IRDye 680	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA	WB	10000
gt-IgG (H+L)	dk	IRDye 680	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA	WB	10000
rb-IgG (H+L)	dk	HRP	Dianova, Hamburg	WB	2000
ms-IgG (H+L)	gt	HRP	Dianova, Hamburg	WB	5000
gt-IgG (H+L)	dk	HRP	Dianova, Hamburg	WB	5000
rt-IgG (H+L)	dk	HRP	Dianova, Hamburg	WB	5000
rb-IgG (H+L)	dk	Cy5	Dianova, Hamburg	RPPA HT-29	1500
rb-IgG (H+L)	gt	Alexa Fluor 647	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA	RPPA HT-29 RPPA NCCIT	1000
ms-IgG (Fc)	gt (Fab)	Alexa Fluor 647	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA	RPPA HT-29	500
ms-IgG (H+L)	gt	Alexa Fluor 647	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA	RPPA NCCIT	1000
gt-IgG (Fc)	gt (Fab)	Alexa Fluor 647	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA	RPPA HT-29 RPPA NCCIT	500
rt-IgG (H+L)	gt	Alexa Fluor 647	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA	RPPA NCCIT	1000

3.1.7 Antitumorsubstanzen

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Antitumorsubstanzen handelt es sich um proprietäre Leitstrukturen der 4SC AG. Diese, in späten Entwicklungsphasen befindlichen Substanzen, wurden freundlicherweise von der 4SC AG zur Verfügung gestellt.

C1 und C2 gehören zur Substanzklasse der Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi).

C1 ähnelt Vorinostat, fällt in die Klasse der Hydroxamsäuren und besitzt als Pan-HDACi ein breites Wirkspektrum. Im Rahmen einer klinischen Phase-1-Studie wurde eine klinisch relevante *Peak*-Plasmakonzentration von 10 μM bestimmt. Die IC_{50} -Konzentration, bestimmt auf HT-29-Monolayerzellen, liegt bei 1 μM (persönliche Kommunikation 4SC AG).

Bei C2 handelt es sich, analog zu Entinostat, um ein Benzamid-Analogon. Diese Klasse von HDACi inhibieren hauptsächlich HDACs der Klasse I, wobei C2 speziell HDAC1, 2 und 3, nicht aber HDAC8 inhibiert. In Mäusen wurde eine *Peak*-Plasmakonzentration von 10 μM , auf HT-29-Monolayerzellen eine IC_{50} -Konzentration von 0,4 μM bestimmt (persönliche Kommunikation 4SC AG).

Bei C5 handelt es sich um einen Kinesin-Inhibitor, welcher spezifisch das mitotische Kinesin Eg5 inhibiert. Die IC_{50} -Konzentration bestimmt auf HT-29-Monolayerzellen beträgt 20 nM (persönliche Kommunikation 4SC AG).

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Antitumorsubstanzen der 4SC AG

Abkürzungen: HDACi – Histon-Deacetylase-Inhibitor

	Substanzklasse	Stand der Forschung	IC_{50} -Konzentration (HT-29-Monolayerzellen)
C1	HDACi (Hydroxamsäure)	Phase II	1 μM
C2	HDACi (Benzamid-Analogon)	Phase I	0,4 μM
C5	Eg5-Inhibitor	Phase I	0,02 μM

3.1.8 Zelllinien

Zur Generierung von Sphäroiden wurden zwei humane, adhärent wachsende Tumorzelllinien verwendet. Die Zelllinie HT-29 stammt einem primären kolorektalen Adenokarzinom ab und kann gut differenzierte Tumoren der Klasse 1 ausbilden (Fogh und Trempe 1975). Die pluripotente Stammzelllinie NCCIT stammt einem mediastinalen gemischten Keimzelltumor ab. Undifferenzierte NCCIT-Zellen befinden sich in einem Stadium zwischen Seminom und embryonalem Karzinom und können durch Retinsäure somatisch und extraembryonal differenziert werden (Teshima *et al.* 1988, Damjanov *et al.* 1993). Im Folgenden ist der Mutationsstatus der beiden Zelllinien beschrieben.

Tabelle 3: Mutationsstatus der Zelllinie HT-29

Die Informationen wurden COSMIC, dem Katalog somatischer Tumormutationen (*Catalogue of somatic mutations in cancer*) des Wellcome-Trust-Sanger-Instituts entnommen. COSMIC ID: 905939 (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>)

APC	E853	2557G>T	Substitution	<i>nonsense</i>	heterozygot
APC	T1556fs	4666_4667insA	Insertion	<i>frameshift</i>	heterozygot
BRAF	V600E	1799T>A	Substitution	<i>missense</i>	heterozygot
PIK3CA	P449T	1345C>A	Substitution	<i>missense</i>	heterozygot
SMAD4	Q311	931C>T	Substitution	<i>nonsense</i>	homozygot
TP53	R273H	818G>A	Substitution	<i>missense</i>	homozygot

Tabelle 4: Mutationsstatus der Zelllinie NCCIT

Die Informationen wurden COSMIC, dem Katalog somatischer Tumormutationen (*Catalogue of somatic mutations in cancer*) des Wellcome-Trust-Sanger-Instituts entnommen. COSMIC ID: 908441 (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>)

PTEN	R173P	518G>C	Substitution	<i>missense</i>	homozygot
TP53	p.V272fs*73	814delG	Deletion	<i>frameshift</i>	homozygot

Um die Antikörper mittels Western Blot zu charakterisieren, wurden weitere humane Zelllinien eingesetzt: Die Zelllinie DLD-1 entstammt einem kolorektalen Adenokarzinom (Dexter *et al.* 1979). Mit der schwach differenzierten Zelllinie HCT-116 und der stark differenzierten Zelllinie GEO wurden zwei kolorektale Karzinomzelllinien verwendet (Brattain *et al.* 1981, 1982). Um die Bedeutung des Peptidarrays zur Charakterisierung modifikationsspezifischer Anti-Histon-Antikörper aufzuzeigen, wurden außerdem HeLa-Zellen verwendet, welche einem humanen Cervixkarzinom entstammen (Gey *et al.* 1952, Scherer *et al.* 1953).

Die Zelllinienproben wurden freundlicherweise von zwei Projektpartnern des BMBF-geförderten Spher4Sys-Konsortiums (Förderkennzeichen 0315284B) bereitgestellt. Für die Probenpräparation aus den Zelllinien HT-29, DLD-1, HCT-116 und GEO danke ich der SpheroTec GmbH, für die NCCIT-Proben gilt mein Dank der 4SC AG.

3.1.9 Primäres Patientenmaterial

Zur Generierung primärer Sphäroide bei der SpheroTec GmbH, wurde Tumorgewebe von vier Kolontumorpatienten verwendet. Dieses wurde im Rahmen des BMBF-geförderten Projekts Spher4Sys (Förderkennzeichen 0315284B) vom Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München bereitgestellt. Die Untersuchungen waren von der lokalen Ethikkommission genehmigt.

3.1.10 Monolayer- und Sphäroidproben

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Detektion von Proteinexpressions- und Modifikationsmustern nach Behandlung von Sphäroiden mit Antitumorsubstanzen. Es wurde sorgfältig darauf geachtet, den durch die Behandlung verursachten Proteinzustand bis zur Detektion zu fixieren. Um enzymatische Prozesse weitestgehend zu minimieren, wurden sämtliche Präparationsschritte ab der Zellernte unter Kühlung durchgeführt. Nach der Ernte wurden die Proben sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Erst nach Zugabe des denaturierenden Lysepuffers wurden die Proben wieder aufgetaut, da nun der Proteinstatus der Zellen permanent fixiert war.

Die HT-29- und NCCIT-Proben sowie die Sphäroide aus Patientenmaterial wurden freundlicherweise von Projektpartnern des Spher4Sys-Konsortiums bereitgestellt (3.1.8 und 3.1.9). Die HeLa-Zellproben wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Ulrich Rothbauer, Pharmazeutische Biotechnologie, Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt.

Im Folgenden ist die Herstellung der Zellproben, welche von den Projektpartnern durchgeführt wurde, kurz erläutert.

3.1.10.1 HeLa-Monolayerkultur

500.000 HeLa-Zellen wurden pro Kavität in eine 6-er Zellkulturplatte ausgesät. Nach 24-stündiger Kultivierung in DMEM mit 4,5 g/l Glukose, 2 mM Glutamin und 10 % FKS (fetales Kälberserum) bei 5 % CO₂ und 37 °C wurde bei einer Konfluenz von 90 % mit der Behandlung begonnen. Die Zellen wurden für 24 h mit 0,05 µg/ml Colcemid in HBSS bzw. 0,1 µg/ml Paclitaxel in DMSO behandelt. Zur Kontrolle diente Medium sowie 0,01 % HBSS und 0,01 % DMSO.

3.1.10.2 HT-29-Monolayerkultur

30 µl Zellsuspension mit je 150.000 Zellen wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde bei 12 Replikaten jeweils 30 µl Restlösung im Reaktionsgefäß belassen, bei 6 Replikaten wurde das PBS weitestgehend abgesaugt. Die Proben wurden sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren.

3.1.10.3 HT-29-Sphäroide

In einer 96-er Mikrotiterplatte wurden pro Kavität 50.000 HT-29-Zellen für 48 h kultiviert, sodass sich Sphäroide ausbildeten. Die Sphäroide wurden entsprechend Tabelle 5 behandelt. Bei der Ernte wurden je drei identisch behandelte Sphäroide in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt. Die Sphäroide wurden zweimal mit PBS gewaschen, pro

Waschschrift wurden 30 µl Restlösung im Reaktionsgefäß belassen. Die Sphäroide wurden in 30 µl PBS in Flüssigstickstoff schockgefroren. Pro Behandlung wurden drei technische Replikate hergestellt, für die Kontrollbehandlung mit 0,2 % DMSO fünf Replikate.

Tabelle 5: Behandlungsbedingungen für die HT-29-Sphäroide

Substanz	Konzentration	Konzentration [µM]	Lösungsmittel	Dauer
C1	10xIC ₅₀ , 100xIC ₅₀	10 µM, 100 µM	DMSO	46 h
C2	10xIC ₅₀ , 100xIC ₅₀	4 µM, 40 µM	DMSO	46 h
C5	10xIC ₅₀ , 100xIC ₅₀	0,2 µM, 2 µM	DMSO	46 h

3.1.10.4 NCCIT-Sphäroide

3.1.10.4.1 NCCIT-Sphäroide für den Einsatz im RPPA

Je 500 NCCIT-Zellen wurden pro Kavität in 96-er Mikrotiterplatten ausgesät. Durch Kultivierung für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ in FGF-haltigem Medium (Fibroblasten-Wachstumsfaktor, *fibroblast growth factor*) bildeten sich Sphäroide aus. Je 10 Sphäroide pro Kavität wurden in einer 24-er Mikrotiterplatte vereinigt und nach 1 h gemäß Tabelle 6 behandelt. Es wurden jeweils drei Replikate hergestellt, als Kontrolle dienten mit 0,1 % DMSO behandelte Sphäroide in acht Replikaten. Eine Gruppe von Sphäroiden wurde ohne Behandlung zum Zeitnullpunkt geerntet (10 Replikate). Zur Ernte wurde der Inhalt einer Kavität der 24-er Mikrotiterplatte in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Sphäroide wurden dreimal mit 500 µl PBS gewaschen und dabei in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt, pro Waschschrift wurden 30 µl Restlösung im Reaktionsgefäß belassen. Anschließend wurden die Sphäroide mit 30 µl PBS in Flüssigstickstoff schockgefroren.

Tabelle 6: Behandlungsbedingungen der NCCIT-Sphäroide für die RPPA-Analyse

Substanz	Konzentration	Konzentration [µM]	Lösungsmittel	Dauer
C1	1xIC ₅₀ , 10xIC ₅₀	2 µM, 20 µM	DMSO	0,5 h, 2 h, 6 h, 24 h, 48 h
C2	1xIC ₅₀ , 10xIC ₅₀	2 µM, 20 µM	DMSO	0,5 h, 2 h, 6 h, 24 h, 48 h

3.1.10.4.2 NCCIT-Sphäroide für den Einsatz im Western Blot

Die Generierung und Behandlung der Sphäroide erfolgte analog zu 3.1.10.4.1. Zur Behandlung wurden jedoch 190 Sphäroide pro Kavität einer 6-er Mikrotiterplatte vereinigt,

für die Lösungsmittelkontrolle 580 Sphäroide. Für den Zeitnullpunkt wurden 770 Sphäroide vor Behandlung geerntet. Es wurden keine technischen Replikate hergestellt, inkubiert wurde gemäß Tabelle 7.

Tabelle 7: Behandlungsbedingungen der NCCIT-Sphäroide für die Western Blot-Analyse

Substanz	Konzentration	Konzentration [μM]	Lösungsmittel	Dauer
C1	10xIC ₅₀	10 μM	DMSO	6 h, 24 h
C2	10xIC ₅₀	4 μM	DMSO	6 h, 24 h
C5	10xIC ₅₀	0,2 μM	DMSO	6 h, 24 h

3.1.10.5 Primäre Sphäroide aus Patientenmaterial

Die Zellen des Biopsats wurden vereinzelt, je 50.000 Zellen pro Kavität wurden in eine 96-er Mikrotiterplatte ausgesät und zur Ausbildung von Sphäroiden für 48 h kultiviert. Bei der Ernte wurde der Inhalt von je drei Kavitäten in einem 0,5 μl Reaktionsgefäß vereinigt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS, wobei jeweils 30 μl Restvolumen übrig gelassen wurden, wurden die Sphäroide mit 30 μl PBS in Flüssigstickstoff schockgefroren.

Von vier Patienten wurden je drei Reaktionsgefäße mit jeweils drei Sphäroiden hergestellt.

3.2 Biochemische Methoden

3.2.1 Lyophilisierung der Proben

Um die Ausgangsbedingungen zu standardisieren und eine effiziente Lyse zu gewährleisten, wurden die in 30 μl PBS vorliegenden Sphäroidproben vor der Lyse mittels Lyophilisierung getrocknet. Dabei wurden die Proben durchgehend gekühlt und tauten nicht auf. Die NCCIT-Sphäroide wurden in einem Gefriertrockner lyophilisiert, die HT-29-Sphäroide in einem Vakuumrotationsverdampfer.

Die Lyophilisierung im Gefriertrockner erfolgte in gekühlten Messingblöcken direkt in der Kühlfalle, neben der -80 °C kalten Kühlschlange. Bei ca. 2 mbar wurden für 16,5 h bis zu 185 Proben gleichzeitig lyophilisiert. Die Lyophilisierung mittels Vakuumrotationsverdampfers erfolgte für 70 min für je 40 Proben gleichzeitig. Die Proben wurden aus Flüssigstickstoff direkt in den gekühlten Rotationsverdampfer gestellt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die getrockneten Proben bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Denaturierende Probenlyse

Um den Modifikations- und Expressionszustand der Proteine zu fixieren, erfolgte die Probenlyse unter denaturierenden Bedingungen.

Zu den getrockneten und gefrorenen Sphäroidproben wurde entsprechend Tabelle 8 Lysepuffer pipettiert. Nach kurzer Zentrifugation erfolgte die Lyse für 30 min bei 1.400 rpm und 22 °C im Reaktionsgefäßeschüttler. Die Proben für den RPPA wurden mit 45 µl Verdünnungspuffer versetzt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 22 °C und 18.000 g wurden zelluläre Bestandteile pelletiert, nur der Überstand wurde weiter verwendet. Ein Probenaliquot für die Proteinbestimmung wurde entnommen, alle Proben wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis auf Weiteres bei -80 °C gelagert.

Tabelle 8: Verwendete Volumina an Lysepuffer

Zelllinie	Anwendung	Behandlung	Sphäroidmenge	Volumen Lysepuffer [µl]
HT-29	alle	alle	3	5
NCCIT	RPPA	alle	10	5
NCCIT	Western Blot	C1, C2, C5	190	25
NCCIT	Western Blot	DMSO	580	90
NCCIT	Western Blot	Zeitnullpunkt	770	70

3.2.3 Native Probenlyse

Die HeLa-Zellen wurden in der Kulturplatte zweimal mit 3 ml eiskaltem PBS gewaschen und anschließend pro Kavität mit 250 µl eiskaltem nativem Lysepuffer für 30 min bei 4 °C unter Schütteln lysiert. Die Lysate wurden ohne Zentrifugation sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Menge an Protein in den denaturierend lysierten Proben wurde nach Bradford bestimmt (Bradford 1976). Die in Druckpuffer vorliegenden Sphäroidproben für den RPPA wurden 1 : 2 mit Druckpuffer verdünnt, die in Lysepuffer vorliegenden Sphäroidproben für die Western Blots 1 : 20 mit Lysepuffer. In einer 96-er Mikrotiterplatte wurden im Duplikat je 5 µl Probenverdünnung mit 150 µl Bradford-Reagenz versetzt und nach ca. 10 min die Absorption bei 570 nm bestimmt. Als Referenz diente eine Standardreihe von 0-1 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) in Druckpuffer bzw. Lysepuffer.

3.2.5 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinkonzentration der nativ lysierten Zellen wurde nach Lowry bestimmt (Lowry *et al.* 1951). Die in nativem Lysepuffer vorliegenden Zelllysate wurden 1 : 2 mit Lysepuffer verdünnt und zentrifugiert. In einer 96-er Mikrotiterplatte wurden in 5-er Replikaten je 5 µl Probenverdünnung entsprechend dem Protokoll mit Reagenzien versetzt. Die Absorption wurde nach 20 min bei 650 nm bestimmt. Als Referenz diente eine Standardreihe von 0-1,5 mg/ml BSA in nativem Lysepuffer.

3.2.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das verwendete Gelelektrophoresesystem funktioniert nach dem Prinzip der diskontinuierlichen denaturierenden Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970).

Alle Proben wurden mit 4 x LDS-Probenpuffer und 10 x Reduktionmittel versetzt. Die nativ lysierten HeLa-Zellen wurden sofort für 16 min im Wasserbad auf 75 °C erhitzt und anschließend auf einen konstanten Proteingehalt von 1,25 µg/ml eingestellt. Alle denaturierend lysierten Proben wurden auf einen konstanten Proteingehalt sowie einen konstanten Gehalt an Lysepuffer eingestellt und anschließend für 11 min auf 70 °C erhitzt. Es wurden 1 mm dicke 4-12 %ige Bis-Tris-Gele mit 17 Taschen verwendet, wobei zwischen 5 und 15 µg Protein geladen wurden sowie ein Protein-Größenstandard zur Referenzierung. Die Elektrophorese wurde für ca. 2 h bei 150 V im Eisbad in gekühltem MES-Puffer mit Antioxidanzmittel durchgeführt.

3.2.7 Western Blot

Mittels Nasstransferverfahren wurden die Proteine aus der Gelmatrix auf eine 0,2 µm dicke Nitrozellulosemembran transferiert (Towbin *et al.* 1979). Der Transfer in gekühltem Transferpuffer mit 10 % Methanol erfolgte im Eisbad für 1 h bei 30 V.

Zur Transferkontrolle wurden die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine mittels Ponceau S für ca. 10 min auf einem Orbitalschüttler reversibel angefärbt. Mit H₂Odd wurde die Membran soweit entfärbt, dass Proteinbanden sichtbar wurden. Nach Detektion eines Auflichtbildes mit der ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) wurde die Membran mit TBST vollständig entfärbt.

Um freie Stellen auf der Nitrozellulosemembran zu blockieren, wurde diese auf dem Orbitalschüttler in 25 ml 5 % Milchpulver in TBST für 60 min inkubiert. Die Inkubation mit Primärantikörpern erfolgte in 1 % BSA in TBST über Nacht bei 4 °C oder für 4 h bei

Raumtemperatur auf dem Taumelroller (Antikörperverdünnungen siehe Tabelle 20). Anschließend wurde die Antikörperlösung abgekippt, einmal kurz mit 10 ml TBST gespült und dann fünfmal für je 5 min mit 10 ml TBST gewaschen. Die speziesspezifischen, mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Sekundärantikörper wurden im Dunkeln in 5 % Milchpulver in TBST für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Taumelroller inkubiert (Antikörperverdünnungen siehe Tabelle 1). Anschließend wurde erneut wie beschrieben gewaschen, dann wurde die Membran getrocknet. Die Detektion erfolgte bei den Anregungswellenlängen 685 nm und 785 nm im *ODYSSEY Infrared Imaging System* (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Es wurden 16-bit Graustufenbilder mit einer Auflösung von 84 µm detektiert.

3.2.8 Charakterisierung von Antikörpern für den Einsatz im *Reverse Phase* Protein-Mikroarray

Um mit *Reverse Phase* Protein-Mikroarrays (RPPA) valide Ergebnisse zu generieren, ist die Qualität der verwendeten Antikörper essentiell. Aus diesem Grund wurden alle Antikörper mittels Western Blot auf ihre Spezifität getestet. Hierbei macht man sich zunutze, dass beim Western Blot im Gegensatz zum *Reverse Phase* Protein-Mikroarray, durch Gelelektrophorese größenspezifisch aufgetrennte Proteine detektiert werden.

Die Charakterisierung der Antikörper fand auf relevantem humanem Zelllinienmaterial statt. Neben den Kolonkarzinomzelllinien HT-29, GEO, DLD-1 und HCT-116 wurde die Keimzelltumorzelllinie NCCIT verwendet. Die Proben wurden entsprechend der obigen Beschreibungen bearbeitet, Western Blots wurden hergestellt und mit den zu untersuchenden Antikörpern inkubiert. Die in den Absätzen 3.2.2 bis 3.2.7 beschriebenen Protokolle wurden dabei wie folgt abgeändert:

- Die Proben wurden nicht lyophilisiert, sondern der Überstand wurde möglichst vollständig abgenommen. Das Lysepuffervolumen wurde so angepasst, dass Proteinkonzentrationen um 10-18 mg/ml resultierten.
- Zur Gelelektrophorese wurden Gele mit einer einzelnen breiten Tasche verwendet, in welche 400 µg Protein in einem Volumen von 250 µl geladen wurden. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V für ca. 65 min, der Transfer auf die Nitrozellulosemembran bei 30 V für 80 min. Anschließend wurden die Membranen in 3 % BSA in TBST blockiert.
- Vor der Antikörperinkubation wurden die Nitrozellulosemembranen getrocknet und in ca. 1-2 mm breite Streifen geschnitten. Die Zuordnung zum Größenstandard war durch entsprechende Markierung der Streifen gewährleistet.

- Jeder Antikörper wurde auf Membranstreifen mit den relevanten Proben inkubiert. Die Inkubationen fanden in je 2,5 ml 1 % BSA in TBST statt, zum Waschen wurden jeweils 5 ml TBST verwendet.
- Zum Auslesen mittels Chemilumineszenz wurden an Meerrettichperoxidase gekoppelte Sekundärantikörper verwendet (Tabelle 1). Die nach Reaktion mit einem Substrat erfolgte Lichtemission wurde mit der ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) detektiert. Als Substrat dienten 2,5 ml ECL Entwicklungsreagenz, in welchem die Membran für 5 min inkubiert wurde.

Die Charakterisierung von Antikörpern wird in unserer Arbeitsgruppe bereits seit längerem durchgeführt (Knorpp 2008). Diese bereits vorhandenen Daten fließen in die Kategorisierung der Antikörper ein.

Je nach Verhältnis der Intensitäten von spezifischer Bande zu den Nebenbanden wurden alle eingesetzten Antikörper im Rahmen dieser Arbeit kategorisiert:

Alle Antikörper, deren Inkubation eine einzelne Bande erwarteter Größe zur Folge hatte, wurden der Kategorie 1 zugeordnet. Diese Antikörper erkennen ihr Antigen spezifisch, zeigen keine Kreuzreaktivität zu anderen Proteinen und können daher im RPPA eingesetzt werden. Antikörper der Kategorie 2 erkennen vor allem ihr spezifisches Antigen, außerdem in geringem Maße wenige weitere Proteine, was sich an leichten Nebenbanden zeigt. Das Signal der spezifischen Bande übersteigt aber das Summensignal aller Nebenbanden deutlich. Auch diese Antikörper sind im RPPA anwendbar, genauso Antikörper der Kategorie 4, welche weder die spezifische noch sonstige Banden erkennen; dabei handelt es sich meist um modifikationsspezifische Antikörper. Da das entsprechende Antigen möglicherweise in den untersuchten Proben nicht modifiziert vorliegt, handelt es sich höchstwahrscheinlich um spezifische Antikörper. Antikörper der Kategorie 3 können nicht ohne Weiteres im RPPA verwendet werden, da sie im Western Blot mehrere starke Nebenbanden zeigen.

Wenn gegen ein interessantes Antigen kein Antikörper der Kategorien 1, 2 oder 4 verfügbar war, wurden auch Antikörper der Kategorie 3 eingesetzt. Die RPPA-Ergebnisse dieser Antikörper wurden jedoch besonders kritisch betrachtet und nur diskutiert, wenn sie in den Kontext umgebender Signaltransduktionswege passten. Wenn möglich wurden die im RPPA detektierten Unterschiede retrospektiv mittels Western Blot auf denselben Proben bestätigt. Die Kategorisierung der im RPPA eingesetzten Antikörper kann Tabelle 20 entnommen werden.

3.3 Mikroarray-Methoden

3.3.1 Herstellung von *Reverse Phase Protein-Mikroarrays*

Die denaturierend lysierten Proben wurden mit dem kontaktlosen, piezoelektrischen Mikroarrayer auf planaren Glasobjektträgern, den Mikroarray-Chips, immobilisiert. Die verwendeten Mikroarray-Chips besitzen eine Oberfläche aus Tantalpentoxid mit einer Monolage aus selbstausgerichteten Alkylphosphaten, an die Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen binden können (Textor *et al.* 2000). Die Fluoreszenzdetektion erfolgt mittels planarer Wellenleitertechnologie, wofür an den Längsseiten der Mikroarray-Chips Beugungsgitter eingätzt sind (Heyse *et al.* 1995, Pawlak *et al.* 2002a). Durch Einkoppeln des Anregungslichts ins linke Gitter entsteht über dem Mikroarray-Chip ein evaneszentes Feld, über das rechte Gitter wird wieder ausgekoppelt.

Jeder Mikroarray-Chip besteht aus sechs Subarrays mit jeweils 380 Probenspots, angeordnet in 19 Spalten und 20 Zeilen (siehe auch 1.5.1). Jeder Spot hat ein Volumen von 400 pl und einen Durchmesser von 150 µm. Der Abstand von Spotmitte zu Spotmitte beträgt in x-Richtung 280 µm, in y-Richtung 300 µm.

In die Spalten 1, 10 und 19 wurden Referenzproben, bestehend aus Alexa647-markiertem BSA aufgebracht, um Signalunterschiede zu korrigieren, die durch die Position der Proben auf dem Subarray entstehen. Für die Referenzlösung wurde 1,6 mg/ml BSA-Alexa647 in PBS 1 : 75.000 in PBS und Verdünnungspuffer mit 0,1 mg/ml BSA verdünnt und durch eine Filtereinheit mit 0,65 µm Porengröße filtriert.

Die lysierten Sphäroidproben waren direkt nach der Lyse 1 : 10 mit Verdünnungspuffer versetzt und bei -80 °C gelagert worden. Nach Auftauen, Vortexen und Zentrifugation bei 18.000 g und 22 °C für 5 min, wurde ein definiertes Volumen des Überstandes abgenommen und in einer 96-er Mikrotiterplatte mit Druckpuffer verdünnt (Tabelle 9). Anschließend wurden 20-25 µl der verdünnten Probe vom Pipettierroboter in eine 384-er Mikrotiterplatte, die Druckplatte, überführt.

Die Proteinkonzentration der auf dem Mikroarray-Chip immobilisierten Proben variierte. Es wurde jeweils ein konstantes Volumen an Lysat verwendet, wobei eine Proteinkonzentration von 0,1–0,4 mg/ml angestrebt wurde. Sämtliche Details zu den Proben können der Probenliste im Anhang entnommen werden (Tabelle 22).

Tabelle 9: Verdünnung der Sphäroidproben für den Druck der Protein-Mikroarrays

	Volumen Lysat [μ l]	Volumen Druckpuffer [μ l]
HT-29-Sphäroide	18,0	47,0
NCCIT-Sphäroide	39,0	26,0
HT-29-Sphäroide (für Vergleich mit Patienten-Sphäroiden)	22,5	47,5
Patienten-Sphäroide	40,0	30,0

Die Proben wurden bei einem Luftfluss von 0,3 m/s unter Reinraumbedingungen (Reinraumklasse 100) und bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 58-63 % und ca. 23 °C Raumtemperatur auf die Mikroarray-Chips aufgebracht. Dabei wurde die Druckplatte auf 11 °C und die Mikroarray-Chips auf 20 °C gekühlt, um ein Eintrocknen der Proben zu verhindern. Zur Kontrolle der Probenabgabe wurden einige mit wassersensitivem Papier beklebte Mikroarray-Chips mitgeführt.

Die Sphäroidproben wurden in unterschiedlichen Formaten auf die Mikroarray-Chips aufgebracht. Bei den HT-29-Sphäroiden wurden vom Pipettierroboter vier Verdünnungen mit Faktor 1,6 generiert, welche als Duplikatspots auf die Mikroarray-Substrate aufgebracht wurden. Bei den NCCIT-Sphäroiden wurden dieselben Verdünnungsreihen hergestellt, diese wurden jedoch als Einzelspots gedruckt. Die Patienten-Sphäroide sowie die zum direkten Vergleich verwendeten HT-29-Sphäroide wurden als Duplikatspots in einer Verdünnung gedruckt.

Nach dem Drucklauf wurden die Mikroarray-Chips für 1 h bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet und anschließend blockiert. Das Blockierreagenz wurde mithilfe eines Ultraschallverneblers in feinen Nebeltröpfchen auf die Mikroarray-Chips aufgebracht, bis die Mikroarray-Chips am Ende des Blockiervorgangs vollständig mit Puffer benetzt waren. Die Mikroarray-Chips wurden in speziellen Steckgehäusen in der Mikroarray-Blockierstation für 45 min mit BSA-haltigem Blockierreagenz benebelt. Anschließend wurden sie für je 1 min in drei Wannen mit H₂O₂ gewaschen und nach Trocknung durch dreiminütige Zentrifugation bei 200 g im Dunkeln bei 4-8 °C gelagert. Einzelne Mikroarray-Chips wurden mit dem nicht-proteinhaltigen Blockierreagenz StabilGuard inkubiert, um später die im Mikrospot immobilisierte Menge an Protein zu bestimmen. Der Blockiervorgang mit StabilGuard erfolgte für 30 min, überschüssiger Puffer wurde unter fließendem H₂O₂ abgewaschen, die Mikroarray-Chips mit N₂ trocken geblasen und im Dunkeln bei 4-8 °C gelagert.

3.3.2 Bestimmung der immobilisierten Proteinmenge

Durch Reaktion von Aminogruppen, die auf dem Mikroarray-Chip immobilisierten Proteine, mit einer Aktivestervariante des Fluorophors Alexa647, wurde die Menge an immobilisiertem Protein bestimmt.

Hierfür wurden pro Drucklauf 2-4 Mikroarray-Chips mit StabilGuard, einem nicht-proteinhaltigen Blockierreagenz, blockiert. Durch Einbau der Mikroarray-Chips in einen ZeptoCARRIER (Bayer Technology Services, Leverkusen) ergaben sich pro Mikroarray-Chip sechs Inkubationskammern, entsprechend den sechs Subarrays, welche individuell inkubiert werden konnten. Die Mikroarray-Chips wurden für 10 min mit Labelingpuffer inkubiert. Anschließend wurden 12 µl Alexa Fluor 647 Carboxylsuccinimidylester ($c = 0,0137 \text{ mg/ml}$ in DMSO) in 1188 µl Labelingpuffer verdünnt und sofort je 90 µl pro Subarray zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl TBST gestoppt. Nach zweimaligem Waschen mit TBST wurde der Mikroarray-Chip aus dem ZeptoCARRIER ausgebaut, unter fließendem H_2O gewaschen und mit N_2 trocken geblasen. Nach Einbau in einen neuen ZeptoCARRIER wurden alle Subarrays mit 100 µl Labelingpuffer befüllt und bei einer Anregungswellenlänge von 635 nm im ZeptoREADER (Bayer Technology Services, Leverkusen) ausgelesen. Von den auf dem Mikroarray-Chip immobilisierten, fluoreszenzmarkierten Proteinen, wurden mit einer 12-bit CCD-Kamera Graustufenbilder generiert, welche als 16-bit TIFF-Dateien gespeichert wurden. Folgende Einstellungen wurden am ZeptoREADER gewählt.

Tabelle 10: Einstellungen am ZeptoREADER zur Detektion der immobilisierten Proteinmenge

	Bild 1	Bild 2	Bild 3	Bild 4	Bild 5	Bild 6
Emissionsfilter	aus	an	an	an	an	an
Belichtungszeit [s]	0,3	1	1	1	1	2
Graufilter	0,01	0,1	0,25	0,5	1,0	1,0

3.3.3 Immunoassay auf planaren Protein-Mikroarrays

Bis zu sechs Mikroarray-Chips können in einen ZeptoCARRIER (Bayer Technology Services, Leverkusen) eingebaut werden, wodurch auf dem Mikroarray-Chip sechs voneinander unabhängige, den sechs Subarrays entsprechende, Inkubationskammern mit einem Volumen von je 15 µl entstehen. Jede dieser Inkubationskammern kann individuell mit Lösung befüllt werden, welche durch eine Vakuum-Absaugstation über die Auslassöffnung wieder entfernt werden kann. Somit kann jeder Subarray eines Mikroarray-Chips individuell inkubiert werden.

Die Antikörperverdünnungen wurden anhand von Erfahrungswerten festgesetzt und erfolgten in Assaypuffer entsprechend Tabelle 20. Zuvor wurden die Antikörper für 5 min bei 16.200 g und 4 °C zentrifugiert. Teilweise wurden die Antikörperverdünnungen zudem durch Filter mit 0,22 µm Durchmesser filtriert.

Die Inkubationskammern wurden zweimal luftblasenfrei mit je 200 µl Assaypuffer befüllt, anschließend wurde 100 µl Antikörperlösung aufgegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 200 µl Assaypuffer wurden je 100 µl der speziesspezifischen, fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper zugegeben und für 45 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert (Tabelle 1). Nach zweimaligem Waschen mit 200 µl Assaypuffer wurden die Inkubationskammern zur Detektion mit 200 µl Assaypuffer befüllt. Die Detektion erfolgte im ZeptoREADER bei einer Anregungswellenlänge von 635 nm. Die Graustufenbilder der 12-bit CCD-Kamera wurden als 16-bit TIFF-Dateien gespeichert. Folgende Einstellungen wurden am ZeptoREADER gewählt.

Tabelle 11: Einstellungen am ZeptoREADER zur Detektion der Immunoassays

	Bild 1	Bild 2	Bild 3	Bild 4	Bild 5	Bild 6	Bild 7	Bild 8
Emissionsfilter	aus	an						
Belichtungszeit [s]	0,3	1	1	1	2	4	8	16
Graufilter	0,01	0,25	0,5	1	1	1	1	1

3.3.4 Bildanalyse von planaren Protein-Mikroarrays

Die Bildanalyse erfolgte mit der Software ZeptoVIEW (Bayer Technology Services, Leverkusen) wobei die Versionen 2.0 und 3.1 verwendet wurden. Vergleichende Analysen der beiden Softwareversionen hatten gezeigt, dass mit beiden Versionen dieselben Ergebnisse generiert werden.

Die Methodenentwicklung sowie einige Immunoassays der HT-29-Sphäroide wurden mittels ZeptoVIEW 2.0 ausgewertet, alle anderen Analysen erfolgten mit ZeptoVIEW 3.1. Das Prozedere der Auswertung wird im Folgenden erklärt, sofern nicht anders beschrieben, wurden jeweils die Standardeinstellungen verwendet.

3.3.4.1 Bildanalyse mittels ZeptoVIEW 3.1

Ein Raster mit den Dimensionen eines Subarrays (x-Richtung 280 µm, y-Richtung 300 µm) wurde mittels *Feature*-Algorithmus auf die einzelnen Subarrays angepasst. Beim verwendeten Algorithmus werden Spots in einem definierten Bereich gesucht, anhand der gefundenen Spots wird dann das Raster ausgerichtet. Da die Position der einzelnen Spots minimal vom Optimum abweichen kann, wurden die Spots über einen zweiten

Feature-Algorithmus innerhalb des Rasters ausgerichtet. Dabei wurde eine Mobilität von 60 % in x- und y-Richtung erlaubt. Der Durchmesser der Spots wurde standardmäßig auf 170 µm eingestellt, aber abhängig vom tatsächlichen Durchmesser auf maximal 240 µm vergrößert. Bei sehr schwachen Signalen wurde für die Ausrichtung der Spots der COG-Algorithmus (*center of gravity*) verwendet, welcher Spots nahe der optimalen Position sucht. Die Rasterausrichtung bei den HT-29-Sphäroiden wurde mittels *Intensities*-Algorithmus durchgeführt, hierbei wird das Raster aufgrund der Pixelintensitäten angepasst. Die Anpassung der Rasterperiode wurde in jedem Fall deaktiviert.

Dem zur Auswertung verwendeten Spotsignal lag jeweils die mittlere Signalintensität zugrunde. Der lokale Hintergrund wurde zwischen den einzelnen Spots mit einer *Interzone* von 66 % gemessen und verrechnet.

Das Bild mit der optimalen Belichtungszeit wurde von ZeptoVIEW 3.1 vollautomatisch nach Standardeinstellungen gewählt. Wenn das automatisch gewählte Bild offensichtlich Sättigungseffekte aufwies, wurde manuell das höchstbelichtete Bild ohne Sättigungseffekte gewählt.

Die Berechnung der probenspezifischen Signalwerte erfolgte bei Duplikatspots durch Berechnung eines fehlergewichteten Mittelwerts, bei Verdünnungsreihen wurde ein fehlergewichteter Wert bei mittlerer Konzentration extrapoliert. Die Fehlergewichtung beruht unter anderem auf Homogenität und Form des Spotsignals. Äußere Einflüsse wie Verschmutzungen, Kratzer, Überblend- oder Hintergrundeffekte wurden von ZeptoVIEW 3.1 meist selbstständig korrigiert, teils wurden solche Effekte manuell verbessert.

Da der Anregungslaser ins Gitter links neben den Subarrays eingekoppelt wird und sich das evaneszente Anregungsfeld von links nach rechts über den Mikroarray-Chip ausbreitet, kommt es in dieser Richtung zu einem Abfall des Anregungssignals. Zur Korrektur dieses Abfalls dienten die in die Spalten 1, 10 und 19 (siehe 3.3.1) gespotteten Referenzen, mit welchen für jeden Probenspot ein Korrekturfaktor berechnet wurde. Wenn der erwartete Signalabfall nicht detektiert werden konnte, wurde in ZeptoVIEW 3.1 der *LinQuad*-Algorithmus aktiviert.

Die für den einzelnen Immunoassay erzeugten Signalwerte wurden um Primärantikörper-unspezifische Effekte korrigiert. Hierfür wurde für jeden Sekundärantikörper ein Immunoassay ohne Primärantikörper durchgeführt, welcher vom Signal des jeweiligen Primärantikörpers subtrahiert wurde. Es wurden jeweils die Signale bei der höchsten gemessenen Belichtungszeit subtrahiert.

Bei den HT-29-Sphäroiden wurden teilweise nur sehr schwache Referenzsignale bei den

Immunoassays ohne Primärantikörper detektiert. Um diese zu korrigieren, wurde entweder auf Subtraktion der Primärantikörper-unspezifischen Effekte verzichtet, oder die Referenzsignale wurden durch einen artifiziellen Faktor erhöht.

Des Weiteren wurden die um Primärantikörper-unspezifische Effekte korrigierten Probensignalwerte auf die immobilisierte Proteinmenge normiert, welche wie in 3.3.2 beschrieben bestimmt worden war. Für diese Normalisierungsassays wurde der gewichtete Mittelwert für jede Probe bestimmt und daraus probenspezifische Proteinfaktoren berechnet.

Die als Ergebnis für jede Probe erhaltenen relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI) mit Standardabweichung wurden aus ZeptoVIEW 3.1 exportiert und zur weiteren Analyse verwendet.

3.3.4.2 Bildanalyse mittels ZeptoVIEW 2.0

Für die Auswertung mit ZeptoVIEW 2.0 wurde manuell das höchstbelichtete Bild, welches noch keine Sättigungseffekte aufwies, ausgewählt. Raster und Spots wurden mittels COG-Algorithmus (*center of gravity*) mit einer Mobilität der Spots in x- und y-Richtung von je 75 % ausgerichtet. Die Rasterdimensionen wurden wie bei ZeptoVIEW 3.1 gewählt (x-Richtung 280 µm, y-Richtung 300 µm) und die Spotgröße konstant auf 170 µm gesetzt. Der lokale Hintergrund wurde zwischen den Spots mit einer *Interzone* von 6 Pixeln detektiert. Für jeden Spot wurde der Mittelwert der relativen Fluoreszenzeinheiten (MFU, *mean fluorescence units*) gebildet, welcher nach Korrektur um den lokalen Hintergrund in Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) exportiert wurde.

Mithilfe der in den Spalten 1, 10 und 19 (siehe 3.3.1) gespotteten Referenzproben wurde um Signalunterschiede korrigiert, welche durch den Abfall des Anregungssignals über dem Subarray entstehen. Da die Proben jeweils in Verdünnungsreihen im Duplikat gedruckt waren, wurde mit den Mittelwerten der Duplikate eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt und konzentrationsunabhängige Werte berechnet. Daraus ergab sich der probenspezifische Signalwert mit zugehöriger Standardabweichung, welcher um Primärantikörper-unspezifische Effekte und die immobilisierte Proteinmenge korrigiert wurde. Hierfür wurden jeweils die Signale der Sekundärantikörper bei der entsprechenden Belichtungszeit subtrahiert. Die für jede Probe ermittelte Menge an immobilisiertem Protein wurde durch den Medianwert dividiert, wodurch probenspezifische Proteinfaktoren entstanden. Diese wurden mit den um Primärantikörper-unabhängige Effekte bereinigten Signalwerten verrechnet. Die sich ergebenden Standardabweichungen wurden durch Fehlerfortpflanzung ermittelt. Wenn bei sehr kleinen Signalen, durch den Abzug von Primärantikörper-unspezifischen

Effekten, minimal negative Signale auftraten wurden diese positiviert in die Auswertung übernommen.

3.3.5 Mikrosphärenbasierter Peptidarray

Der verwendete Peptidarray basiert auf der xMAP-Technologie (Luminex, Austin, TX, USA). Ausgelesen wurde mit einer FLEXMAP 3D, die bis zu 500 farbig markierte Mikrosphärenpopulationen unterscheiden kann. In diesem Peptidarray sind auf 2 x 192 Mikrosphärenpopulationen 384 Peptide der Histone H2A, H2B, H3 und H4 immobilisiert. Pro Peptid können bis zu vier Aminosäuren in modifizierter Form vorliegen, wodurch sämtliche relevanten Modifikationen von Histonschwänzen repräsentiert werden (Bock *et al.* 2011, Heubach *et al.* 2013). Die eingesetzte Technik zur Generierung des Peptidarrays war von Dr. Oliver Pötz und Cornelia Sommersdorf in unserer Arbeitsgruppe entwickelt worden. Für ihre Unterstützung bei der Durchführung danke ich Cornelia Sommersdorf.

Die Durchführung erfolgte mit einem Pipettierroboter, welcher mit einem 96-er Magnetkopf die Mikrosphären zwischen den Inkubationsplatten transportierte. Alle verwendeten 96-er Mikrotiterplatten wurden mit PBST bzw. 1 % BSA in PBST blockiert und anschließend mit 100 µl Lösung befüllt. Es lagen zwei Suspensionen mit je 192 peptidbelegten Mikrosphären vor. Die Suspensionen wurden sonifiziert und gevortext, jeweils 500 Mikrosphären pro Population wurden in Platte 1 vorgelegt. Die zu testenden Antikörper wurden 1 : 250 in 1 % BSA in PBST verdünnt und in Platte 2 pipettiert. Der Pipettierroboter überführte die Mikrosphären aus Platte 1 in die Antikörperlösung zur sechzigminütigen Inkubation. In zwei Waschplatten wurden die Mikrosphären mit PBST gewaschen und anschließend für 45 min mit dem entsprechenden PE-markierten Sekundärantikörper inkubiert (PE, Phycoerythrin). Nach zwei weiteren Waschrufen wurden die Mikrosphären in 1 % BSA in PBST eluiert. Die Detektion mittels FLEXMAP 3D erfolgte pro Kavität in 80 µl innerhalb von 60 s. Der über 100 Mikrosphären bestimmte Median der Fluoreszenzintensitäten wurde ausgegeben (MFI, *mean fluorescence intensity*). Als Positivkontrolle dienten mit c-Myc bzw. Biotin belegte Mikrosphären, die mit PE-markiertem Anti-c-Myc-Antikörper bzw. Streptavidin detektiert wurden. Eine Inkubation ohne Primärantikörper wurde als Negativkontrolle mitgeführt.

3.4 Darstellung und Analyse von Datensätzen

3.4.1 Fehlerfortpflanzung

Für die Auswertung mit ZeptoVIEW 2.0 wurden drei fehlerbehaftete Größen miteinander verrechnet: probenspezifischer Signalwert, Primärantikörper-unspezifische Effekte und der Proteinfaktor. Die resultierende Standardabweichung wurde nach den folgenden Regeln der Fehlerfortpflanzung ermittelt.

Um den Einfluss einer fehlerbehafteten Größe x auf das Endergebnis y abzuschätzen, wurde das Endergebnis als Funktion der fehlerbehafteten Größe betrachtet, es wurde nach der fehlerbehafteten Größe abgeleitet und mit ihrem absoluten Fehler multipliziert.

$$y = y(x) \Rightarrow \Delta y = \left| \frac{dy}{dx} \right| \cdot \Delta x$$

Formel 1: Berechnung des Fehlers in Abhängigkeit einer fehlerbehafteten Größe

Wenn mehrere fehlerbehaftete Größen x_i bei der Ermittlung des Endergebnis y beachtet werden mussten, so wurden die Einflüsse von x_i auf y quadratisch addiert, solange die Fehler der Größen x_i voneinander unabhängig waren und sich nicht gegenseitig beeinflussten.

$$y = y(x_1, x_2, \dots, x_n) \Rightarrow \Delta y^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 \cdot \Delta x_i^2 \Rightarrow \Delta y = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 \cdot \Delta x_i^2}$$

Formel 2: Berechnung des Fehlers in Abhängigkeit mehrerer fehlerbehafteter Größen

3.4.2 Datentransformation

Um trotz stark unterschiedlicher Signalintensitäten verschiedene Immunoassays in gemeinsamen Diagrammen darstellen zu können, wurden alle Signalwerte auf den jeweiligen Mittelwert der Kontrollbehandlung normiert. Für eine äquidistante Darstellung faktorieller Unterschiede, beispielsweise in *Heatmaps*, wurden die Werte außerdem zur Basis 2 logarithmiert.

Lagen für ein Antigen Signalwerte von Gesamtform und modifizierter Form vor, so wurde dessen relative Aktivität berechnet. Hierfür wurde das Verhältnis von modifizierter Form

zur Gesamtform gebildet, welches mit dem Zusatz R zum Proteinnamen gekennzeichnet wurde.

3.4.3 Hierarchische Clusteranalysen

Um Ähnlichkeiten zwischen Proben oder Analyten ausfindig zu machen und um diese zu gruppieren, wurde das Verfahren der Clusteranalyse verwendet. Unter Clusteranalyse versteht man multivariante Verfahren zur Ermittlung von Gruppen (Clustern) zusammengehöriger Objekte aus einer Grundmenge von numerisch beschriebenen Objekten. Bei diesen Objekten kann es sich beispielsweise um Datensätze von Messwerten handeln, in denen Ähnlichkeiten und Hierarchien gefunden werden sollen. Die dafür verwendeten Algorithmen können hierarchisch oder partitionierend sein, des Weiteren muss, je nach Algorithmus, eine Distanzfunktion zur Bestimmung des Abstands zweier Elemente $d(a,b)$ bekannt sein. Die Ergebnisse der hierarchischen Clusteranalysen wurden in Form von *Heatmaps* dargestellt, wobei die Ähnlichkeit der Objekte durch die baumartigen Strukturen verdeutlicht wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Software MeV (*TM4 Microarray Software Suite*) zur Erstellung von Clusteranalysen verwendet (Saeed *et al.* 2003, 2006). Die Datensätze wurden Mittelwert-zentriert und zur Basis 2 logarithmiert für die Analyse verwendet. Als Maßstab für die Ähnlichkeit wurde euklidische Distanz (*euclidean distance*) und als Clustering Methode vollständige Verknüpfung (*complete linkage*) gewählt, da sich diese Kombination zur Darstellung logarithmierter Daten als besonders geeignet erwiesen hat (D'haeseleer 2005).

$$d_{ab} = \sqrt{\sum_c (e_{ac} - e_{bc})^2}$$

Formel 3: Formel der euklidischen Distanzfunktion

3.4.4 Statistische Signifikanztests

Statistische Tests helfen komplexe Datensätze zu organisieren, zu analysieren und letztendlich zu interpretieren. In dieser Arbeit wurden statistische Verfahren genutzt, um Unterschiede zwischen Behandlungsgruppen aufzuzeigen. Die Analysen wurden mit der Software MeV (*TM4 Microarray Software Suite*) durchgeführt (Saeed *et al.* 2003, 2006).

3.4.4.1 T-Test

Der T-Test gehört zur Gruppe der parametrischen Verfahren und prüft, ob sich die Mittelwerte zweier Stichproben systematisch voneinander unterscheiden. Hierfür wurden die untransformierten Messwerte (RFI) der einzelnen Replikate manuell zwei Probengruppen zugewiesen. Da aufgrund der kleinen Gruppengröße keine gleichen Varianzen angenommen werden konnten, wurde die Welch-Näherung für ungleiche Varianzen verwendet (Welch 1947). Die p-Werte wurden aus der theoretischen T-Verteilung berechnet. Um für multiples Testen zu korrigieren, wurde die Bonferroni-Methode angewandt, wobei der kritische p-Wert auf 0,05 gesetzt wurde.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}}$$

Formel 4: Welch T-Test zur parametrischen Varianzanalyse zweier Gruppen

3.4.4.2 Kruskal-Wallis-Rangsummentest

Beim Kruskal-Wallis-Rangsummentest handelt es sich um ein nicht-parametrisches Verfahren der Varianzanalyse. Der Test weist mit hoher Sensitivität Unterschiede zwischen Probengruppen nach, ohne dabei die absoluten Schwankungen zu beachten. Dieser Test wurde verwendet, um mehr als zwei Probengruppen zu vergleichen. Die Mittelwert-zentrierten und zur Basis 2 logarithmierten Messwerte wurden manuell den drei Probengruppen zugewiesen.

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \left(\sum_{i=1}^l \frac{R_i^2}{n_i} \right) - 3(n+1)$$

Formel 5: Kruskal Wallis Rangsummentest zur nicht-parametrischen Varianzanalyse für mehr als zwei Gruppen

3.4.5 Datenevaluierung des Peptidarrays

Zur Klassifikation der mittels Peptidarrays auf ihre Spezifität getesteten Antikörper wurde ein Schwellenwert bestimmt, um die spezifischen Signale vom Hintergrundrauschen zu trennen. Hierfür wurden die 379 Peptide des Peptidarrays für jeden Antikörper in relevante (spezifische Antikörperbindungsstelle vorhanden) und nicht-relevante (keine spezifische Antikörperbindungsstelle vorhanden) Peptide eingeteilt. Für die nicht-relevanten Peptide wurde eine lognormale Verteilung angenommen und für jeden Antikörper Mittelwert μ und Standardabweichung σ derselben berechnet. Mit μ und σ in

der Quantilfunktion wurde der Schwellenwert berechnet, unter dessen Wert 99,9 % aller Hintergrundsignale fielen. MFI-Werte oberhalb dieses Schwellenwerts wurden als spezifisches Signal angesehen.

Dieser Klassifikator wurde mithilfe des positiven Vorhersagewerts PPV (*positive predictive value*) beurteilt. Alle Antikörper mit einem PPV größer als 0,6 wurden als spezifisch klassifiziert (Klasse II). Antikörper mit einem PPV von 1,0 wurden als hochspezifisch klassifiziert (Klasse I). Alle anderen Antikörper wurden als unspezifisch klassifiziert (Klasse III). Waren für einen Antikörper keine relevanten Peptide im Array vertreten oder wurde mit weniger als 3 Peptiden ein Signalwert oberhalb des Schwellenwerts erreicht, so wurde dieser Antikörper nicht klassifiziert (Klasse na).

$$PPV = \frac{\text{Anzahl echt positiver Signale}}{\text{Anzahl echt positiver Signale} + \text{Anzahl falsch positiver Signale}}$$

Formel 6: Berechnung des positiven Vorhersagewerts PPV

Zusätzlich wurden nach folgenden Regeln Sensitivität und Spezifität für jeden Antikörper berechnet:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl echt positiver Signale}}{\text{Anzahl echt positiver Signale} + \text{Anzahl falsch negativer Signale}}$$

Formel 7: Berechnung der Sensitivität

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl echt negativer Signale}}{\text{Anzahl echt negativer Signale} + \text{Anzahl falsch positiver Signale}}$$

Formel 8: Berechnung der Spezifität

Dieses Verfahren zur Evaluierung der hier dargestellten Daten wurde von Hannes Planatscher entwickelt, die Evaluierung erfolgte in enger Zusammenarbeit mit ihm. Das komplette System ist in Heubach *et al.* (2013) beschrieben.

4. Ergebnisse

Die Analyse von Tumorsphäroiden stellt eine besondere Herausforderung dar, da ein Sphäroid aus nur 10.000-100.000 Zellen besteht. Um trotzdem eine weitreichende Expressions- und Modifikationsanalyse durchführen zu können, ist eine hochsensitive Proteinanalytik erforderlich. *Reverse Phase* Protein Mikroarrays (RPPA) als sensitives immunologisches Messsystem benötigen im Gegensatz zur Massenspektrometrie nur eine minimale Probenmenge; einige tausend Zellen sind ausreichend, um dutzende Proteine zu untersuchen. Diese Plattform ist somit prinzipiell zur Analyse von Sphäroiden geeignet.

4.1 Methodenentwicklung

4.1.1 Bestimmung der pro Behandlungskondition benötigten Anzahl an Sphäroiden

In unserer Arbeitsgruppe besteht langjährige Erfahrung mit *Reverse Phase* Protein-Mikroarrays, wobei bisher mit Monolayer-Zellkulturproben und Gewebeproben gearbeitet wurde. Material war meist ausreichend vorhanden, sodass die Grenzen der Methode nicht ausgereizt werden mussten. Eine Herausforderung bestand deshalb in der Anpassung der Methode an die Analyse kleinster Probenmengen.

Die Detektionsgrenze des Systems liegt bei 1000 Molekülen pro Mikrospot, was in etwa einem Zelläquivalent Protein entspricht. Somit stellen Sphäroide, die aus mehreren tausend Zellen bestehen, an sich keine große Herausforderung an das System dar. Da aber zum Generieren der Mikroarrays ein Vielfaches des immobilisierten Probenvolumens benötigt wird, sollten idealerweise mindestens 16 µg Protein vorhanden sein, um robuste Signale generieren zu können.

Sphäroide wurden aus den Zelllinien HT-29 und NCCIT sowie aus primärem Tumormaterial von Kolonkarzinompatienten hergestellt. Da zu Beginn dieser Arbeit keinerlei Erfahrung mit Sphäroiden vorhanden war, wurde in ersten Versuchen deren Proteingehalt ermittelt, um daraus die pro Behandlungskondition benötigte Anzahl an Sphäroiden zu definieren.

Hierfür wurden unterschiedliche Mengen an Sphäroiden lysiert und anschließend ihr Proteingehalt bestimmt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Proteinbestimmung der Sphäroide

Zur Ermittlung der pro Behandlungskondition für die RPPA-Analyse benötigten Sphäroidmenge wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Die Sphäroide wurden entweder weitestgehend ohne Restvolumen oder mit definierten 30 µl Restvolumen PBS geerntet. Proben mit 30 µl Restvolumen wurden mittels Vakuumrotationsverdampfers (SV) vor der Lyse lyophilisiert. Die Lyse erfolgte in 2,5 oder 5,0 µl Lysepuffer.

Abkürzungen: MW – Mittelwert, SD – Standardabweichung (*standard deviation*), CV – Variationskoeffizient (*coefficient of variation*)

	HT-29	NCCIT	Patient
Zellen pro Sphäroidansatz	50.000	500	50.000
Kultivierungsdauer	48 h	48 h	108 h
Restvolumen PBS	2,2 – 23 µl	30 µl	30 µl
Trocknung	-	SV	SV
Protein pro Sphäroid			
MW	9,0 µg	2,7 µg	4,3 µg
SD	1,1	0,6	1,3
%CV	12,5	22,8	29,9
Fazit für weitere Experimente			
Anzahl Sphäroide pro Kondition	3	10	3

Der Proteingehalt der Sphäroide hängt stark von der zur Sphäroid-Generierung eingesetzten Zellart und -anzahl ab. Während ein HT-29-Sphäroid ca. 9 µg Protein lieferte, konnten aus einem Patienten-Sphäroid nur ca. 4 µg Protein gewonnen werden. Die NCCIT-Sphäroide lieferten knapp 3 µg Protein pro Sphäroid.

Die Bedingungen der Sphäroid-Generierung aus Zelllinien können gut standardisiert werden, daher wird hier nur eine minimale Schwankung zwischen den Experimenten erwartet. Die primären Sphäroide unterscheiden sich jedoch stark, abhängig von Patient und Tumorzusammensetzung. Es sind demnach große Schwankungen zwischen verschiedenen Patienten zu erwarten und diese Ergebnisse stellen nur eine Abschätzung dar. Aus diesem Versuch wurde abgeleitet, dass zukünftig bei den HT-29- und Patienten-Sphäroiden mit je 3 Sphäroiden pro Behandlungskondition gearbeitet wird, bei den NCCIT-Sphäroiden mit jeweils 10 Sphäroiden.

4.1.2 Probenpräparation mittels Lyophilisierung

Durch die Arbeit mit nur wenigen tausend Zellen kleinen Sphäroiden und den daraus resultierenden kleinsten Probenmengen musste die Prozessierung der Sphäroide optimiert werden. Da der Fokus dieser Arbeit auf der Analyse von Proteinexpressions- und Modifikationszuständen liegt, war es besonders wichtig, Veränderungen der Proteine durch die Präparation zu vermeiden. Die Sphäroidernte musste zügig erfolgen und die Proben umgehend in Flüssigstickstoff schockgefroren werden. Durch den

denaturierenden Lysepuffer wurde der Proteinzustand endgültig fixiert. Da lediglich 5 µl Lysepuffer verwendet wurden, könnten schon wenige Mikroliter Varianz die Lyseeffizienz drastisch verändern. Um die Lysebedingungen zu standardisieren, musste sichergestellt werden, dass die Sphäroide in einem konstanten Restvolumen vorlagen.

Zu Beginn wurde versucht, das überschüssige PBS weitgehend mit einer Pipette abzusaugen. So konnte aber kein konstantes Restvolumen erzielt werden, wodurch die Lyseeffizienz zwischen den Proben schwankte. Deshalb wurden die Sphäroide in 30 µl PBS geerntet, schockgefroren und anschließend mittels Vakuumrotationsverdampfers oder Gefriertrockners lyophilisiert. Nach der Lyophilisierung konnte die Lyse in konzentriertem Puffer erfolgen. Dieses Vorgehen beschleunigte die Sphäroidernte und eine Schwankung der Lyseeffizienz durch Verdünnung des Lysepuffers mit variierenden Restvolumina an PBS wurde verhindert. Die Effizienz der Methode wurde mittels RPPA getestet.

Für diesen Test wurden je 150.000 Monolayerzellen der Zelllinie HT-29 geerntet und in PBS aufgenommen. Das PBS wurde entweder weitestgehend abgesaugt (RV) oder definiert 30 µl Restvolumen im Reaktionsgefäß belassen. Die Hälfte der Proben mit 30 µl Restvolumen wurde mittels Gefriertrockners (Lyo), die andere Hälfte mittels Vakuumrotationsverdampfers (SV) getrocknet. Als Indikator für Effizienz und Reproduzierbarkeit der Lyse wurde die Proteinkonzentration bestimmt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Auswirkung der Präparationsmethode auf den Proteingehalt der HT-29-Zelllysate

An HT-29-Zellen wurden drei verschiedene Präparationsmethoden getestet. Je 150.000 Zellen wurden in konstant 30 µl PBS geerntet und dann mittels Gefriertrockners (Lyo) oder Vakuumrotationsverdampfers (SV) lyophilisiert, oder das Volumen wurde von Hand weitgehend abgenommen. Anschließend wurde lysiert und der Proteingehalt der Proben bestimmt.

Abkürzungen: MW – Mittelwert, SD – Standardabweichung, CV – Variationskoeffizient

Präparationsmethode	RV	Lyo	SV
Trocknung	PBS durch Absaugen weitestgehend entfernt	Gefriertrockner	Vakuumrotationsverdampfer
Restvolumen PBS	0,9-5 µl	30 µl	30 µl
Protein pro 150.000 Zellen			
MW	24,9 µg	25,2 µg	30,5 µg
SD	2,1	1,1	1,4
%CV	8,5	4,3	4,5

Die extrahierte Proteinmenge hing stark von der Präparationsmethode ab. Lyophilisierung mittels Vakuumrotationsverdampfers hatte eine um ca. 22 % höhere Lyseeffizienz zur Folge als die Lyse ohne Lyophilisierung. Lyophilisierung mittels Gefriertrockners entsprach der Kontrolle. Die Lyse nach Lyophilisierung führte zu einheitlicheren Ergebnissen, der Variationskoeffizient der extrahierten Proteinmenge lag bei ca. 4,5 %, ohne Lyophilisierung bei 8,5 %.

Mit den Lysaten wurden Mikroarrays generiert, um die Freisetzung membrangebundener, zytosolischer und nukleärer Proteine zu analysieren. In Abhängigkeit von der Präparationsmethode zeigten 18 von 19 Proteinen signifikante Unterschiede in der Proteinmenge (Abbildung 6).

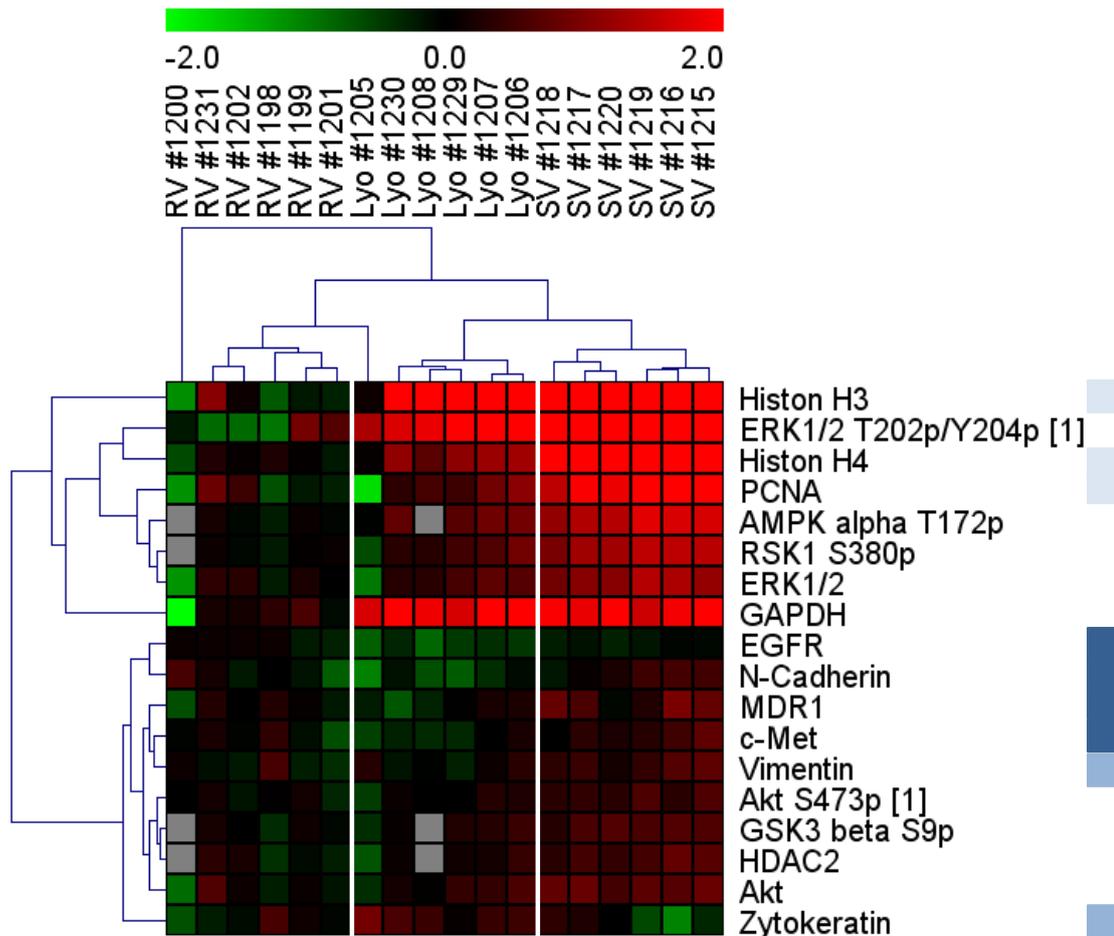


Abbildung 6: Unterschiede im Expressions- und Phosphorylierungsstatus von Proteinen durch die Probenpräparation

Die Expression bzw. Modifikation von 19 Proteinen aus unterschiedlichen Zellkompartimenten wurde analysiert. Die Zuordnung zu den Zellkompartimenten erfolgt durch das blaue Farbschema am rechten Bildrand: dunkelblau – membranständig, mittelblau – zytosolisch, hellblau – nukleär. Die drei Probengruppen ergeben sich durch Unterschiede in der Präparation: Eine Gruppe wurde mit einem minimalen Restvolumen an PBS (RV) lysiert, die anderen wurden durch verschiedene Lyophilisierungsmethoden vor der Lyse getrocknet (Lyo, SV). Dargestellt sind alle, nach Kruskal-Wallis Rangsummentest zwischen den drei Präparationsgruppen, signifikant unterschiedlich exprimierte Proteine. Die Mittelwert-zentrierten und zur Basis 2 logarithmierten Signalwerte der RPPA-Analyse sind nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) entsprechend der Farbkodierung dargestellt. Die Probengruppen sind senkrecht, die analysierten Proteine waagrecht aufgetragen. Graue Felder entsprechen nicht erfassten Werten.

Abkürzungen: RV – Restvolumen PBS, SV - Vakuumrotationsverdampfer (*SpeedVac*), Lyo – Gefriertrockner, # - eindeutiger Probenbezeichner, p – phospho, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten

Senkrecht sind die drei Präparationsgruppen dargestellt, die Ähnlichkeit der Replikate ist gut sichtbar. Insgesamt waren die RPPA-Signale nach Lyophilisierung deutlich stärker, was dafür spricht, dass die Lyseeffizienz durch den Lyophilisierungsschritt erhöht wird. Auch zwischen den beiden Arten der Lyophilisierung sind Unterschiede zu erkennen: Durch Lyophilisierung mittels Vakuumrotationsverdampfers wurde mehr Protein solubilisiert als durch die Gefriertrocknung.

Für membranständige und zytosolische Proteine waren die Signalunterschiede zwischen den Präparationsgruppen eher gering. Besonders deutliche Unterschiede zeigten sich jedoch bei der Solubilisierung von nukleären Proteinen. Nach Lyophilisierung wurden für Histone und PCNA deutlich höhere Signale erhalten. Die Lyophilisierung scheint somit vor allem nukleäre DNA-bindende Proteine zu beeinflussen. Hierfür dürfte der erhöhte Salzgehalt der Lysate verantwortlich sein, der durch Trocknung der 30 µl PBS entsteht. Da in dieser Arbeit insbesondere Expressions- und Modifikationsänderungen von Histonen untersucht werden sollten, ergibt sich durch Lyophilisierung der Proben ein deutlicher Vorteil.

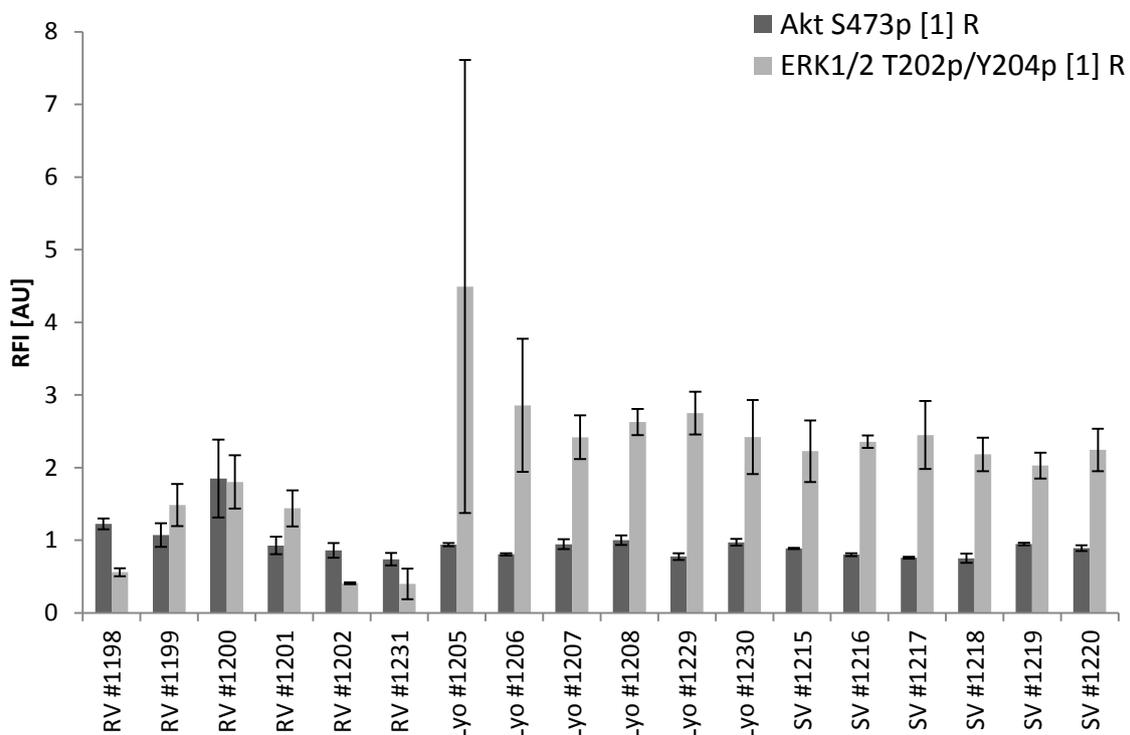


Abbildung 7: Relativer Phosphorylungsstatus der Proteine Akt und ERK1/2

Das RPPA-Signal der phosphorylierten Proteinform wurde mit dem Signal des Gesamtproteins ins Verhältnis gesetzt. Die Median-zentrierten Werte der Verhältnisse sind als relative Fluoreszenzintensitäten (RFI) aufgetragen.

Abkürzungen: RV – Restvolumen PBS, SV - Vakuumrotationsverdampfer (*SpeedVac*), Lyo – Gefriertrockner, # - eindeutiger Probenbezeichner, p – phospho, [1] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten, R – Verhältnis zwischen Phospho- und Gesamtform des entsprechenden Proteins, RFI – relative Fluoreszenzintensität, AU – willkürliche Einheiten (*arbitrary units*)

Betrachtet man den Einfluss der Lyophilisierung auf phosphorylierte Proteinformen, so zeigt sich ein uneinheitliches Bild. Während die Phosphosignale von ERK1/2, AMPK α und RSK1 nach Lyophilisierung mittels Vakuumrotationsverdampfers anstiegen, ergab sich für GSK3 β und Akt keine Änderung. Vergleicht man bei ERK1/2 die Signale von Gesamt- zu Phosphoform, so zeigt sich, dass beide Formen nach Lyophilisierung vermehrt detektiert

wurden, die einzelnen Formen verhielten sich aber nicht proportional (Abbildung 7). Bei Akt kam es nach der Behandlung im Vakuumrotationsverdampfer bei Gesamt- und Phosphoform zu einer minimalen Signalerhöhung, Phospho- und Gesamtprotein veränderten sich proportional.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Varianz der Proteinsolubilisierung durch Lyophilisierung verringert wird und nukleäre Proteine, wie Histone, durch Lyophilisierung besser freigesetzt werden. Die Lyophilisierung ist folglich eine geeignete Methode zur Probenpräparation für den RPPA.

4.1.3 Vergleich des Wachstumsverhaltens von Sphäroiden aus den Zelllinien HT-29 und NCCIT

Die analysierten Sphäroide unterscheiden sich sowohl durch die Zelllinieneigenschaften als auch durch die Generierungsmethode. Während die HT-29-Sphäroide aus 50.000 Zellen generiert wurden, wurden für die NCCIT-Sphäroide 500 Zellen eingesetzt, was sich im Proteingehalt der Sphäroide widerspiegelt (4.1.1). Außerdem wurde beobachtet, dass die NCCIT-Sphäroide während der Behandlungsdauer ständig wachsen, während die HT-29-Sphäroide ihre ursprüngliche Größe beibehalten. Dieses Verhalten konnte mit dem Proteingehalt der Sphäroide korreliert werden (Abbildung 8).

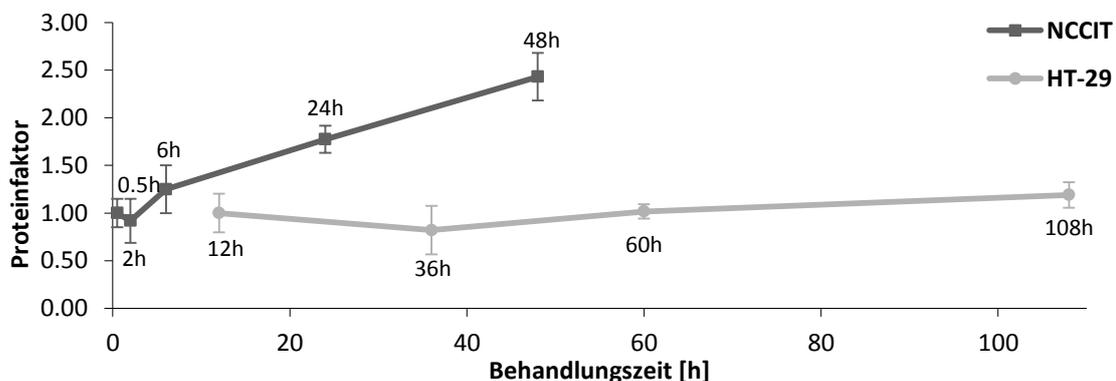


Abbildung 8: Zusammenhang zwischen Wachstumsverhalten und Proteingehalt von Sphäroiden

Aus den Zelllinien NCCIT und HT-29 wurden für 48 h Sphäroide generiert. Diese wurden für die dargestellten Zeitdauern mit DMSO (NCCIT: 0,1 %; HT-29: 0,2 %) in Zellkulturmedium behandelt, nach Lyophilisierung und denaturierender Lyse wurde nach Bradford der Proteingehalt der Sphäroide bestimmt. Die Mittelwerte der Replikate wurden auf den jeweils kleinsten Zeitpunkt normiert und sind als Proteinfaktoren mit Standardabweichung aufgetragen.

Für die HT-29-Sphäroide änderte sich der Proteingehalt im Behandlungszeitraum zwischen 12 h und 108 h nur minimal (Faktor 1,2). Bei den NCCIT-Sphäroiden war

hingegen ein deutlicher Anstieg des Proteingehalts sichtbar: Zwischen 0,5 h und 48 h Behandlungsdauer stieg der Proteingehalt um den Faktor 2,4 an.

Das beobachtete Wachstum der NCCIT-Sphäroide korreliert somit mit dem Anstieg des Proteingehalts, während Größe und Proteingehalt von HT-29-Sphäroiden konstant bleiben.

4.2 Proteinexpressionsanalyse in Patienten-Sphäroiden

Sphäroide können aus Zelllinien oder aus primärem humanem Tumormaterial generiert werden. Besonders heterotypische Sphäroide welche direkt aus Patientenmaterial generiert werden, besitzen viele Charakteristika von Mikrotumoren. Heterotypische Sphäroide bestehen, abhängig von der Zusammensetzung des Patientenmaterials, aus verschiedenen Zelltypen, während aus einzelnen Zelllinien homotypische Sphäroide generiert werden. Die verschiedenen Zelltypen im heterotypischen Sphäroid kommunizieren miteinander, wodurch diese als Tumormodell dienen, was vollkommen neue Möglichkeiten in der Tumorforschung eröffnet.

Aus Biopsien von Tumorpatienten können Zellen vereinzelt und daraus *in vitro* Sphäroide generiert werden. Durch Behandlung der Tumorsphäroide mit Antitumormedikamenten können potentiell wirksame Medikamente definiert werden. Somit kann eine Vielzahl von Medikamenten *ex vivo* direkt auf Patientenmaterial getestet werden und potentiell wirksame Medikamente können bereits im Vorfeld gefiltert und der Patient mit dem für ihn bestgeeigneten Medikament behandelt werden. Dieses Screening-Modell wird zurzeit in klinischen Studien beim Mamma- und Kolonkarzinom getestet, als Auslesesystem dienen einfache Apoptose- oder Vitalitätsassays (SpheroNeo, SpheroPCT).

Das Sphäroid-System kann außerdem in präklinischen Phasen der Medikamentenentwicklung dazu verwendet werden, detaillierte Informationen über die Wirkmechanismen von Antitumorsubstanzen zu erhalten und Unterschiede in ihrer Wirkungsweise zwischen individuellen Patienten zu analysieren.

Für dieses Experiment wurde vier Kolontumorpatienten bei einer Biopsie Tumorgewebe entnommen. Die daraus generierten Sphäroide wurden mit dem, im Rahmen dieser Arbeit, neu etablierten Präparationsprotokoll aufgeschlossen und mittels RPPA analysiert. Zum Vergleich wurden Sphäroide der Zelllinie HT-29 sowie ein Lysat aus HT-29-Monolayerzellen mitgeführt (Tabelle 14).

Tabelle 14: RPPA-Analyse von primären Patienten-Sphäroiden

Sphäroide aus primärem humanem Kolontumormaterial sowie HT-29-Sphäroide wurden mit dem in dieser Arbeit etablierten Protokoll präpariert und mittels RPPA analysiert. Die Konditionen der Sphäroid- und Mikroarraygenerierung sowie die Ergebnisse der Proteinbestimmung sind in dieser Tabelle gelistet.

Abkürzungen: MW – Mittelwert, SD – Standardabweichung, CV – Variationskoeffizient

	HT-29-Sphäroide	Patienten-Sphäroide
Kultivierdauer der Sphäroide	60 h	48 h
Zellen pro Sphäroidansatz	150.000	150.000
Replikate	5	3 je Patient
Protein pro Sphäroid		
MW	15,6 µg	6,1 µg
SD	3,5	2,3
%CV	22,6	37,7
Proteinkonzentration im Mikrosport		
MW	0,30 mg/ml	0,21 mg/ml
SD	0,07	0,08
%CV	22,6	37,7

Die Proteinkonzentration der auf dem Mikroarray immobilisierten Proben variierte. Die mittlere gespottete Proteinkonzentration lag bei den Patienten-Sphäroiden bei 0,21 mg/ml und somit unter dem Optimum von 0,3-0,4 mg/ml, wohingegen die Konzentration der HT-29-Sphäroide im optimalen Bereich lag. Diese suboptimalen Bedingungen für die Patienten-Sphäroiden zeigten teilweise Einfluss auf die RPPA-Analyse (Abbildung 9).

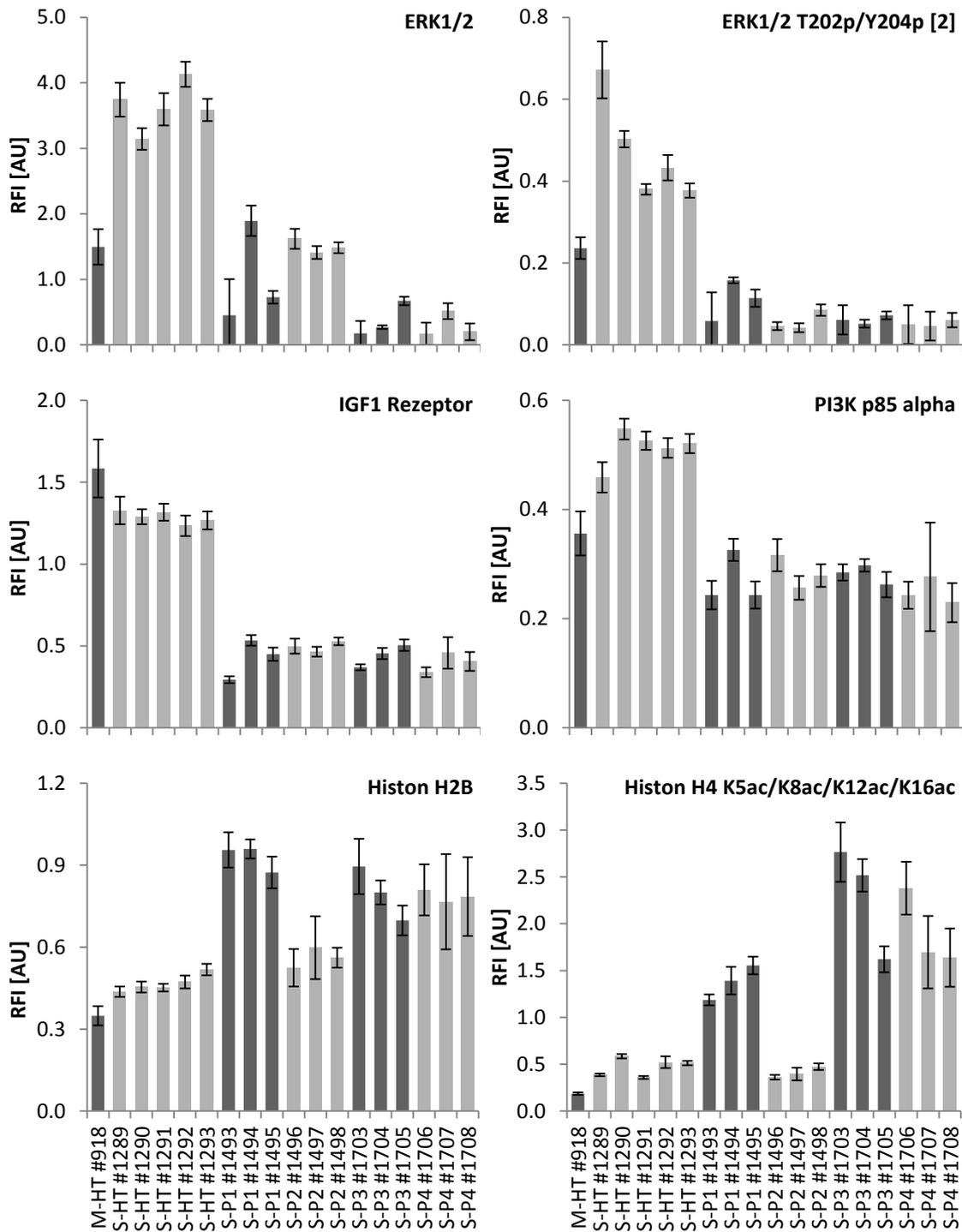


Abbildung 9: RPPA-Analyse der Expression von Proteinen in primären humanen Tumorsphäroiden im Vergleich zu HT-29-Zellliniensphäroiden

In Sphäroiden aus primärem humanem Kolontumormaterial wurde mittels RPPA die Expression bzw. Modifikation von Proteinen analysiert. Zum Vergleich dienten Sphäroide der Zelllinie HT-29 sowie Monolayerzellen. Die um Primärantikörper-unspezifische Effekte und die immobilisierte Proteinmenge korrigierten Signalwerte ausgewählter Proteine sind dargestellt.

Abkürzungen: M-HT – Monolayerzellen der Zelllinie HT-29, S-HT – Sphäroide der Zelllinie HT-29, S-P1 – Sphäroide aus Tumorgewebe des Patienten P1, P1 – Patientenummerierung, # - eindeutiger Probenbezeichner, p – phospho, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten, RFI – relative Fluoreszenzintensität, AU – willkürliche Einheiten (*arbitrary units*)

Abbildung 9 zeigt die RPPA-Signalwerte ausgewählter Proteine für vier Patienten im Vergleich zu den HT-29-Proben.

Bei ERK1/2 wurden große Unterschiede zwischen den Patienten beobachtet, die Patienten P1 und P2 zeigten eine höhere Expression als P3 und P4. Die Signalhöhe war in allen Fällen ausreichend, wenn auch kleiner als bei den HT-29-Sphäroiden und die Standardabweichungen waren gering.

Für phosphoryliertes ERK1/2 (T202p/Y204p) wurden sehr kleine Signale im Bereich des Hintergrundrauschens gemessen, wodurch sich hohe Standardabweichungen ergaben. Unterschiede zwischen den Patienten waren nicht zu erkennen, das Signal der HT-29-Sphäroide war deutlich stärker.

Für IGF1 Rezeptor und PI3K p85 α konnten bei den Patienten-Sphäroiden deutliche Signale mit kleinen Standardabweichungen gemessen werden. Das Signalniveau dieser Proteine war in den Patienten-Sphäroiden deutlich geringer als in den HT-29-Sphäroiden, Unterschiede zwischen den Patienten waren nicht zu erkennen.

Besonders deutliche Signalsteigerungen bei den Patienten-Sphäroiden im Vergleich zu den HT-29-Sphäroiden, konnten bei Histonen beobachtet werden. Vor allem die Expression von Histon H2B und die Acetylierung von Histon H4 waren zwischen den Patienten stark unterschiedlich.

In diesem Experiment wurde deutlich, dass die Analyse stark exprimierter Proteine in Patienten-Sphäroiden möglich ist, wohingegen schwach exprimierte Proteine oder seltene Phosphoproteine nur kleine Signale im Bereich des Hintergrundes und große Schwankungen zwischen den Replikaten zeigten. Für diese seltenen Proteine wäre eine höhere Proteinkonzentration im Mikrospot erstrebenswert, um das Signalniveau zu erhöhen und Schwankungen zu reduzieren. Durch Änderungen im Prozess der Mikroarraygenerierung konnte eine solche Erhöhung in späteren Experimenten erreicht werden und die mittlere gespottete Proteinkonzentration in den optimalen Bereich zwischen 0,3 und 0,4 mg/ml gelegt werden. Der Einfluss dieser Änderungen auf die Detektion selten vorkommender Phosphoproteine wird im Folgenden gezeigt.

Beispielhaft sind die Ergebnisse der beiden Phosphoproteine MEK1/2 S217p/S221p und mTOR S2448p dargestellt (Abbildung 10). Im linken Diagramm wurden die Proben, wie oben beschrieben, mit nur 0,21 mg/ml Protein im Mikrospot gedruckt. Diese Proben zeigten schwache RPPA-Signale mit hohen Standardabweichungen und lassen keine Unterscheidung zwischen den Patienten zu. Durch eine Erhöhung der Proteinkonzentration auf 0,35 mg/ml (Abbildung 10 rechts) setzten sich die Probensignale vom Hintergrundrauschen ab und es ergaben sich homogene Replikate mit kleinen

Standardabweichungen. Die Daten des volumenoptimierten Experiments wurden freundlicherweise von Dr. Ute Metzger für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

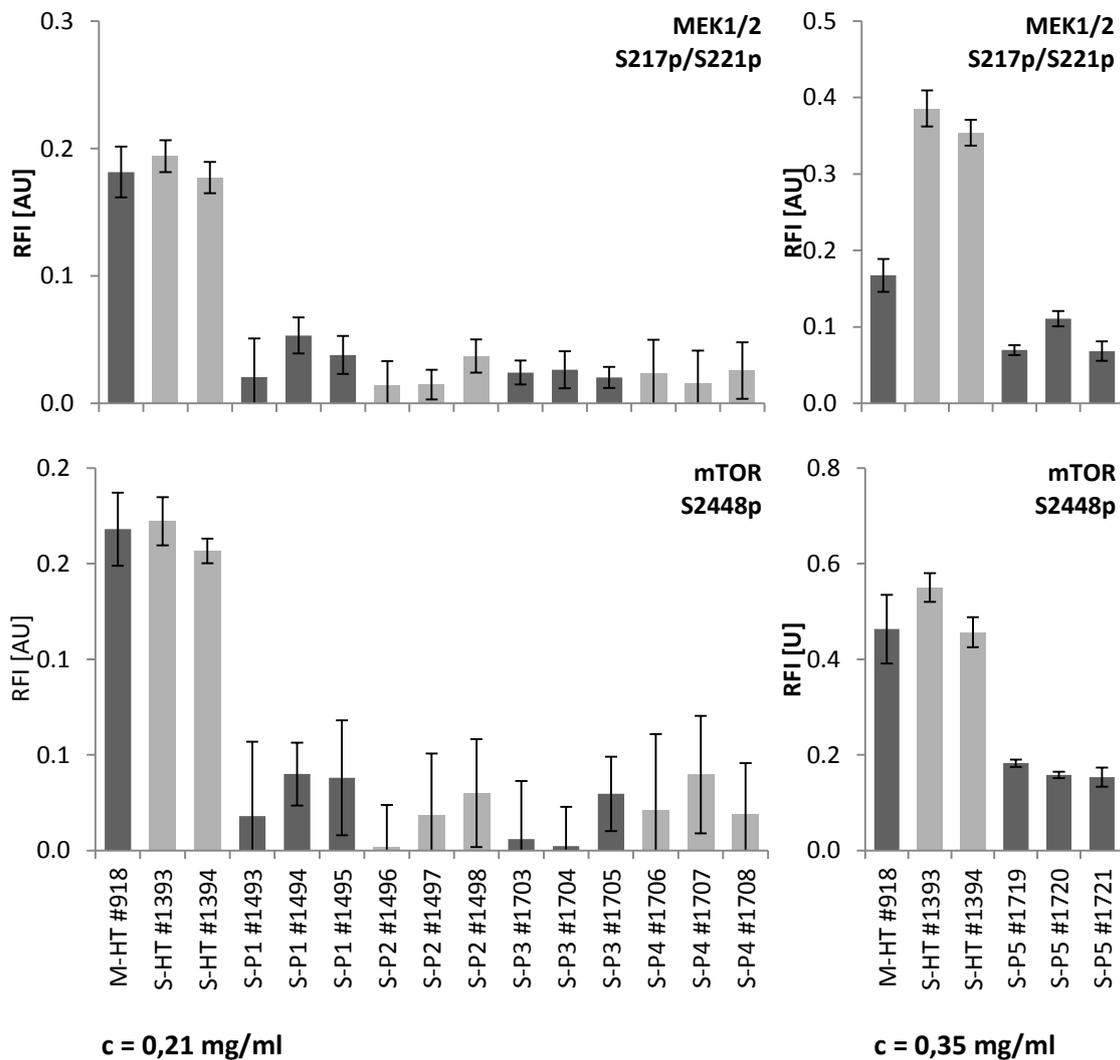


Abbildung 10: Optimierung der RPPA-Analyse von primären humanen Tumorsphäroiden durch Erhöhung der auf dem Mikroarray-Chip immobilisierten Proteinmenge

Sphäroide aus primärem humanem Kolontumormaterial von fünf Patienten wurden im Vergleich mit Sphäroiden der Zelllinie HT-29 sowie Monolayerzellen analysiert. Für die linken Diagramme wurden die Lysate der Patienten-Sphäroide mit einer mittleren Proteinkonzentration von 0,21 mg/ml auf die Mikroarrays gedruckt, für die rechten Diagramme mit einer mittleren Konzentration von 0,35 mg/ml. Die um Primärantikörperunspezifische Effekte und die immobilisierte Proteinmenge korrigierten Signalrohwerte zweier Proteine sind dargestellt.

Abkürzungen: M-HT – Monolayerzellen der Zelllinie HT-29, S-HT – Sphäroide der Zelllinie HT-29, S-P1 – Sphäroide aus Tumorgewebe des Patienten P1, P1 – Patientenummerierung, # - eindeutiger Probenbezeichner, p – phospho, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten, RFI – relative Fluoreszenzintensität, AU – willkürliche Einheiten (*arbitrary units*)

Die Daten der rechten Diagramme wurden freundlicherweise von Dr. Ute Metzger für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Somit konnte gezeigt werden, dass das in dieser Arbeit etablierte System der Probenpräparation auch auf primäre Tumorsphäroide anwendbar ist. Durch Minimierung

des Pipettier Volumens konnte die Methode in weiterführenden Experimenten soweit verfeinert werden, dass auch selten vorkommende Phosphoproteine analysiert werden können. Somit steht eine Methode bereit mit welcher Wirkmechanismen von Antitumorsubstanzen direkt auf primärem Patiententumormaterial analysiert werden können.

4.3 Analyse der Wirkprofile verschiedener Antitumorsubstanzen auf Proteinebene

Das neu etablierte Präparationsverfahren erlaubt einen verlässlichen Proteinnachweis aus Sphäroiden, wobei der Expressions- und Modifikationszustand von bis zu 80 Proben gleichzeitig analysiert werden kann. Der Einsatz von Sphäroiden stellt im Vergleich zur Monolayerkultur einen deutlichen Vorteil dar, da diese der klinischen Situation näher kommen. Durch die dreidimensionale Sphäroidstruktur kommt es zu einem Konzentrationsgradienten der Antitumorsubstanzen innerhalb des Sphäroids und die wirksame Konzentration der Substanzen entspricht eher der *in vivo*-Situation. Mit dem im Rahmen dieser Arbeit neu etablierten System sollen im Folgenden Wirkprofile verschiedener proprietärer Antitumorsubstanzen der 4SC AG untersucht werden und Änderungen, die diese Substanzen in Signaltransduktionskaskaden induzieren, im Detail analysiert werden.

Bei den Substanzen handelt es sich um zwei Klassen von Antitumorsubstanzen: Histon-Deacetylase-Inhibitoren und einen Kinesin-Inhibitor.

Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) stellen eine neue Klasse von Antitumorsubstanzen dar, deren genauer Wirkmechanismus bisher nicht geklärt ist. Sie bewirken eine verstärkte Acetylierung von Histonen, was die Transkription der betroffenen Gene verstärkt, und beeinflussen zusätzlich den Acetylierungsstand von Nicht-Histonproteinen. Vorinostat und Romidepsin stellen zwei erste Vertreter dieser Substanzklasse dar, welche für die Behandlung des kutanen T-Zelllymphoms zugelassen sind.

Antimitotische Substanzen, wie beispielsweise Paclitaxel, werden schon länger zur Behandlung von Tumoren eingesetzt und zeigen durch ihre direkte Wirkung auf Mikrotubuli meist starke Nebenwirkungen. Aus diesem Grund werden antimitotische Substanzen entwickelt, welche spezifisch mitotische Kinesine hemmen.

Sphäroide der Zelllinien HT-29 und NCCIT unterscheiden sich, wie bereits in 4.1.1 gezeigt, deutlich voneinander. Während die einem primären kolorektalen Adenokarzinom

abstammenden HT-29-Zellen gut differenzierte Tumoren ausbilden, besitzen NCCIT-Zellen eine weitreichende Stammzellcharakteristik und entstammen einem mediastinalen gemischten Keimzelltumor. Somit können an HT-29-Sphäroiden Effekte der Antitumorsubstanzen auf ausdifferenzierte Tumoren, an NCCIT-Sphäroiden hingegen Effekte auf Stammzellcharakteristika von Tumorzellen analysiert werden. Des Weiteren unterschieden sich die Zelllinien durch ihren Mutationsstatus; während in beiden Zelllinien p53 mutiert ist, liegt bei NCCIT außerdem PTEN mutiert vor, in HT-29-Zellen APC, b-Raf, PI3K α und Smad4. Die Wirkprofile der Antitumorsubstanzen wurden somit auf zwei unterschiedlichen Modellsystemen analysiert.

4.3.1 Wirkung der Histon-Deacetylase-Inhibitoren C1 und C2 auf Sphäroide der Zelllinie NCCIT

Um die molekularen Veränderungen in NCCIT-Sphäroiden durch Behandlung mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) zu analysieren, wurden je 10 Sphäroide in drei Replikaten mit unterschiedlichen Konzentrationen der Substanzen C1 und C2 behandelt. In diesem Versuch wurde jeweils die einfache und zehnfache IC₅₀-Konzentration eingesetzt. Behandelt wurden die Sphäroide über eine Dauer von 48 h, wobei die Zeitpunkte 0,5 h, 2 h, 6 h, 24 h und 48 h analysiert wurden. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO, außerdem wurden unbehandelte Sphäroide zu Beginn der Behandlung als Zeitnullpunkt gewonnen.

4.3.1.1 Einfluss der Antitumorsubstanzen auf den Proteingehalt der Sphäroide

Für die NCCIT-Sphäroide wurde ein über die Behandlungsdauer hin andauerndes Wachstum beobachtet, welches sich im Proteingehalt niederschlug. Daher soll zunächst der Einfluss der Antitumorsubstanzen auf das Sphäroidwachstum bzw. auf den Proteingehalt der Sphäroide betrachtet werden (Abbildung 11).

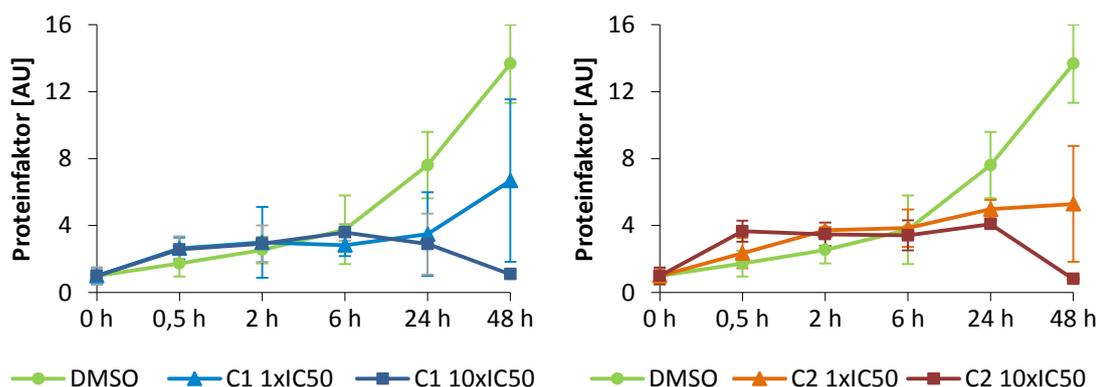


Abbildung 11: Analyse des Proteingehalts von NCCIT-Sphäroiden während der 48-stündigen Behandlungsdauer

NCCIT-Sphäroide wurden in drei Replikaten mit den Substanzen C1 (links) oder C2 (rechts) jeweils in $1xIC_{50}$ und $10xIC_{50}$ behandelt. Als Lösungsmittelkontrolle diente 0,1 % DMSO. Aus der auf dem Mikroarray-Chip immobilisierten Proteinmenge wurden Proteinfaktoren berechnet, welche auf den Zeitnullpunkt normiert wurden. Die Mittelwerte der biologischen Replikate sind mit zugehöriger Standardabweichung aufgetragen. Abkürzungen: AU – willkürliche Einheiten (*arbitrary units*)

Durch Kontrollbehandlung der NCCIT-Sphäroide mit DMSO kam es zu einem annähernd linearen, 14-fachen Anstieg des Proteingehalts. Die Behandlung der Sphäroide mit den Histon-Deacetylase-Inhibitoren C1 und C2 hatte, konzentrationsabhängig, einen geringeren Anstieg zur Folge. Bei Behandlung mit C1 in $1xIC_{50}$ reduzierte sich der Faktor um die Hälfte, bei $10xIC_{50}$ blieb der Proteingehalt konstant. Ähnliche Effekte wurden durch die Behandlung mit C2 sichtbar.

Diese Beeinflussung des Sphäroidwachstums spiegelte sich auch in der weiterführenden Analyse der Wirkprofile von C1 und C2 wider. In den *Heatmaps* fallen viele Analyten durch einen hohen 48 h-Wert auf (Abbildung 13 / Abbildung 14 und Abbildung 16 / Abbildung 17). Dieser Effekt konnte auf die Protein-Normierung zurückgeführt werden. Abbildung 12 zeigt dies beispielhaft am Zeitverlaufdiagramm von GAPDH. Ohne Normierung auf die immobilisierte Proteinmenge (links) nahm das Signal bei Behandlung mit DMSO zu, während das Signal bei Behandlung mit C1 und C2 konstant blieb, analog zum oben beschriebenen Proteinfaktor (Abbildung 11). Die Normierung auf die immobilisierte Proteinmenge führte bei C1 dazu, dass ein konstantes GAPDH-Niveau detektiert wurde, bei C2 in $10xIC_{50}$ kam es hingegen zu einem artifiziell bedingten Signalanstieg. Dieser Effekt ist bei einigen Analyten in der weiteren Auswertung sichtbar, wird aber nicht weiter berücksichtigt.

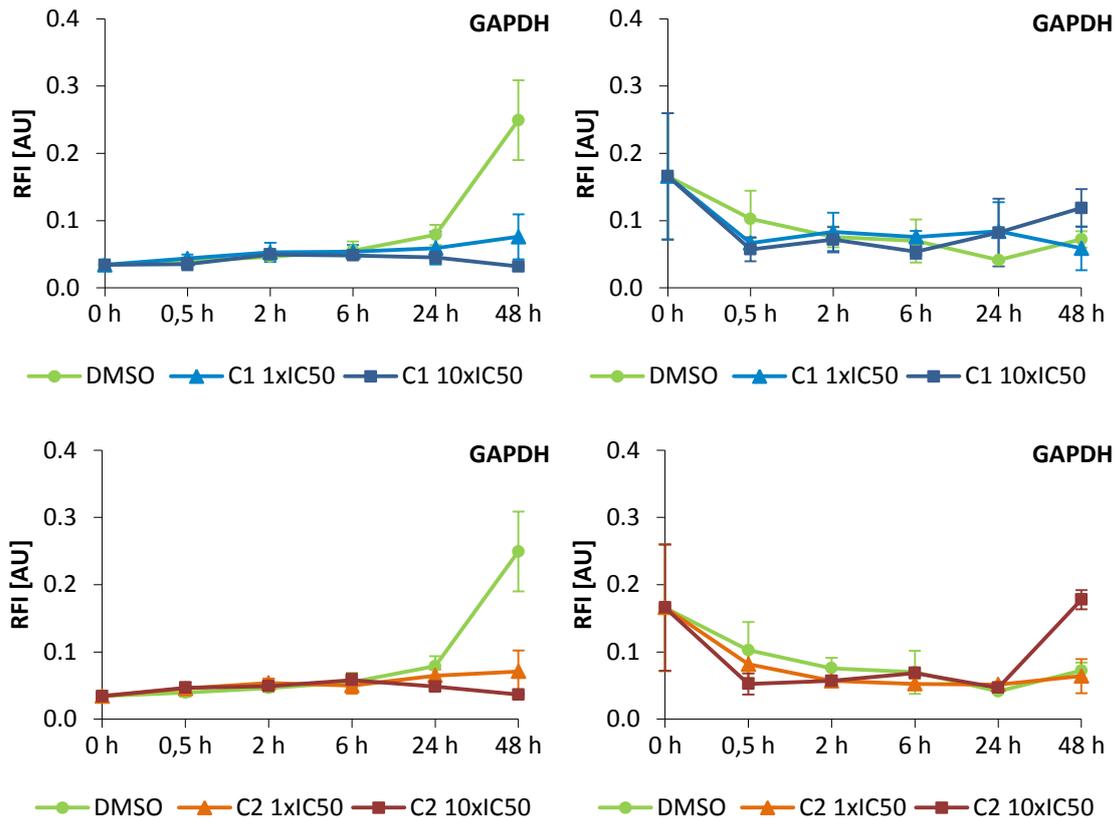


Abbildung 12: Zeitverlauf des GAPDH-Signals ohne und mit Normierung auf die im Mikrospot immobilisierte Proteinmenge

Die für GAPDH detektierten RPPA-Signale der NCCIT-Sphäroide bei Behandlung mit C1 (oben) oder C2 (unten) sind vor (links) und nach (rechts) Normierung auf die im Mikrospot immobilisierte Proteinmenge dargestellt. Die Sphäroide wurden in drei Replikaten mit C1 und C2 in zwei Konzentrationen (1xIC₅₀, 10xIC₅₀) bzw. mit 0,1 % DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Die Mittelwerte der biologischen Replikate sind mit zugehöriger Standardabweichung aufgetragen.

Abkürzungen: RFI – relative Fluoreszenzintensität, AU – willkürliche Einheiten (*arbitrary units*)

4.3.1.2 Wirkprofil von C1 auf Sphäroide der Zelllinie NCCIT

Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der Analyse des Expressions- und Modifikationsstatus von 81 Proteinen nach Behandlung der NCCIT-Sphäroide mit dem HDACi C1. Die um Primärantikörper-unspezifische Effekte bereinigten und auf die Menge an immobilisiertem Protein normierten Signalwerte wurden jeweils auf den Mittelwert der Lösungsmittelkontrollen bezogen. Nach Clusteranalyse kommen ähnlich regulierte Proteine nebeneinander zu liegen. Rote Felder der *Heatmap* deuten eine erhöhte Expression bzw. Modifikation des Proteins an, grüne Felder entsprechend eine Erniedrigung im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle.

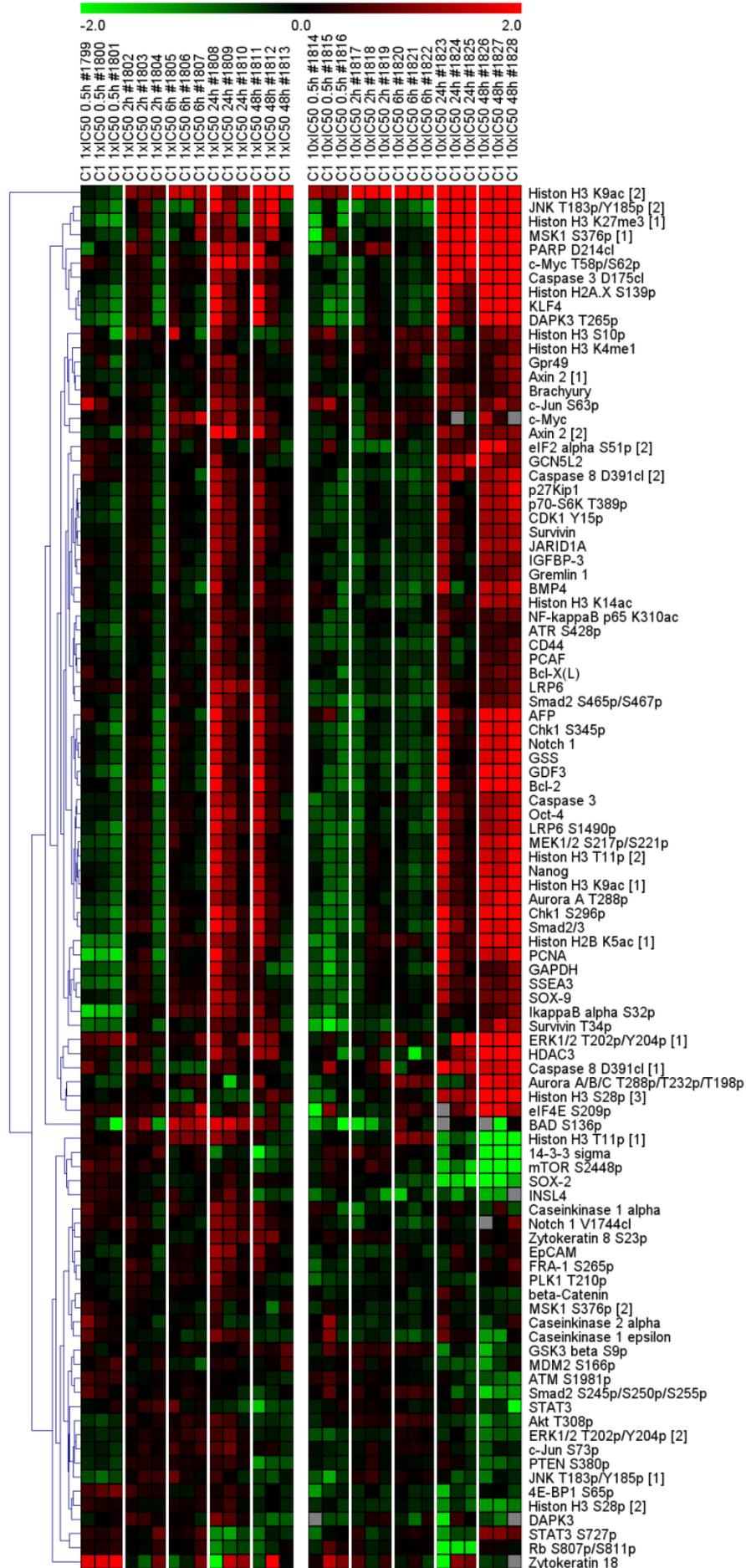


Abbildung 13: Änderungen im Modifikations- und Expressionszustand von Proteinen durch Behandlung von NCCIT-Sphäroiden mit C1

Die Expression bzw. Modifikation von Proteinen in NCCIT-Sphäroiden wurde nach Behandlung mit dem HDACi C1 mittels RPPA analysiert. In der *Heatmap* ist das Verhältnis zwischen Behandlung mit C1 und DMSO dargestellt, wobei jeder Signalwert der C1-Behandlung auf den zeitlich entsprechenden Mittelwert der DMSO-Kontrollen normalisiert und zur Basis 2 logarithmiert wurde. Die Ergebnisse sind nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) entsprechend der Farbkodierung dargestellt. Rot bedeutet eine durch C1 erhöhte, grün eine erniedrigte Expression bzw. Modifikation der Proteine, graue Felder entsprechen nicht erfassten Werten. Die einzelnen Proben sind senkrecht, die analysierten Proteine waagrecht aufgetragen

Abkürzungen: # - eindeutiger Probenbezeichner, p – phospho, ac – acetyl, cl – gespalten (*cleaved*), me1 – monomethyl, me2 – dimethyl, me3 – trimethyl, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten

Der bereits angesprochene, durch die Normierung auf die immobilisierte Proteinmenge erzielte, artifizielle Anstieg der Signale bei 48 h ist bei vielen Analyten zu erkennen. Nur wenn bereits bei kürzeren Zeitpunkten ein Anstieg detektiert werden konnte, wurde dieser Effekt weiter betrachtet. Ein Trend, beginnend bei 24 h, ließ sich beispielsweise bei PARP D214cl, Caspase 3 D175cl und GCN5L2 beobachten. Histon H3 K9ac lag schon 2 h nach Behandlungsstart deutlich acetyliert vor. mTOR S2448p und SOX-2 stellen Beispiele für Proteine dar, die ab 24 h Behandlungszeit herunterreguliert wurden. Bei Behandlung der Sphäroide mit C1 in geringer Konzentration fielen die Effekte insgesamt weniger deutlich aus, was die Konzentrationsabhängigkeit verdeutlicht.

Um die Expressionsänderungen durch Behandlung mit C1 im Detail zu analysieren, wurden für alle Proteine Zeitverlaufdiagramme erstellt. In diesen ist jeweils der Mittelwert der drei biologischen Replikate mit zugehöriger Standardabweichung aufgetragen (Abbildung 15). Abbildung 14 zeigt eine *Heatmap* aller Proteine, deren Effekte anhand der Zeitverläufe bestätigt werden konnten. Die Effekte auf Histone werden in 4.3.3 separat behandelt.

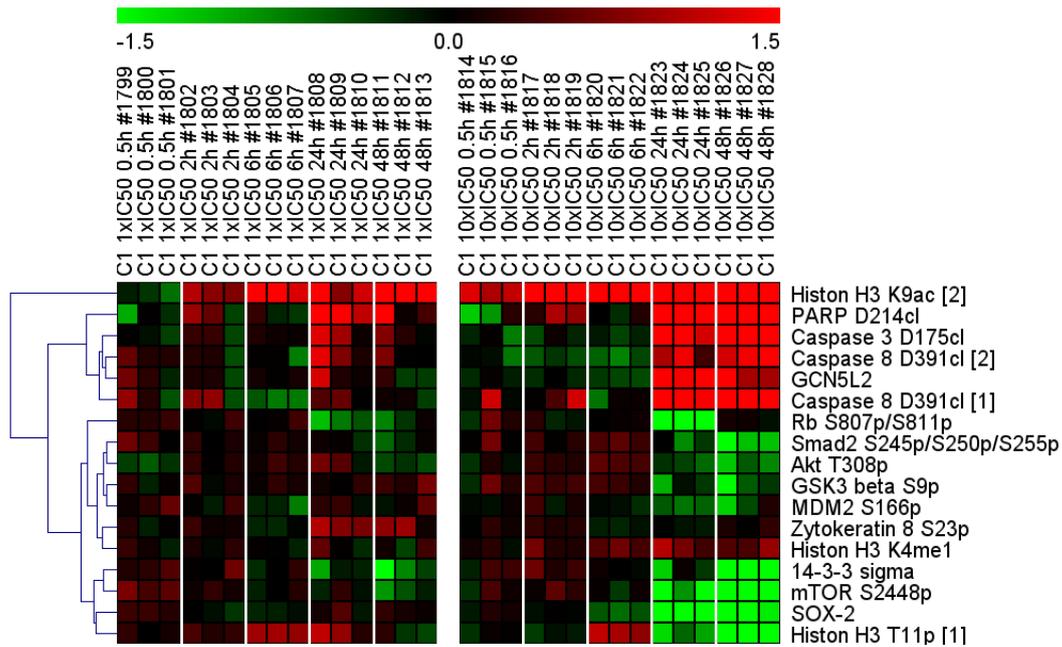


Abbildung 14: Modifikations- und Expressionsstatus differenziell regulierter Proteine nach Behandlung von NCCIT-Sphäroiden mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor C1

Die Expression bzw. Modifikation von Proteinen in NCCIT-Sphäroiden wurde nach Behandlung mit dem HDACi C1 mittels RPPA analysiert. In der *Heatmap* ist das Verhältnis zwischen Behandlung mit C1 und DMSO dargestellt, wobei jeder Signalwert der C1-Behandlung auf den zeitlich entsprechenden Mittelwert der DMSO-Kontrollen normalisiert und zur Basis 2 logarithmiert wurde. Die Signalwerte sind nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) entsprechend der Farbkodierung dargestellt. Rot bedeutet eine durch C1 erhöhte, grün eine erniedrigte Expression bzw. Modifikation der Proteine, graue Felder entsprechen nicht erfassten Werten. Die einzelnen Proben sind senkrecht, die analysierten Proteine waagrecht aufgetragen.

Die Proteine wurden anhand der Zeitverlaufsdiagramme ausgewählt, alle deutlich differenziell exprimierten bzw. modifizierten Proteine sind dargestellt.

Abkürzungen: # - eindeutiger Probenbezeichner, p – phospho, ac – acetyl, cl – gespalten (*cleaved*), me1 – monomethyl, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten

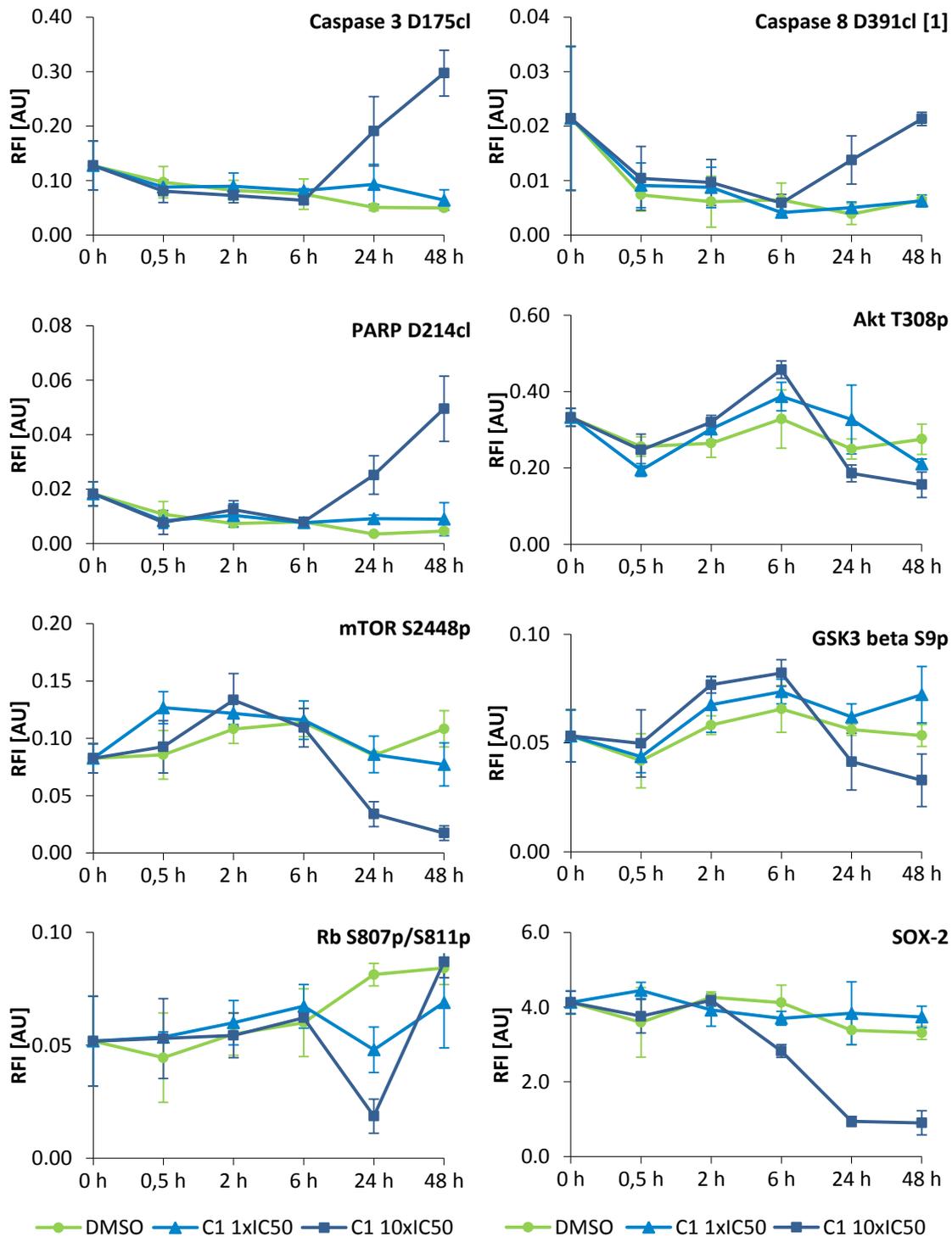


Abbildung 15: Zeitverlauf der Expression und Modifikation ausgewählter Proteine nach Behandlung von NCCIT-Sphäroiden mit C1

NCCIT-Sphäroide wurden in drei Replikaten mit den angegebenen Konzentrationen (1xIC₅₀, 10xIC₅₀) der Substanz C1 behandelt. Als Lösungsmittelkontrolle diente 0,1 % DMSO (je 2-4 Replikate). Der Expressions- und Modifikationsstatus von 81 Proteinen wurde mittels RPPA analysiert. Die Signalwerte wurden auf die immobilisierte Proteinmenge normiert. Die Mittelwerte der Replikate einiger differenziell exprimierter bzw. modifizierter Proteine sind mit zugehöriger Standardabweichung aufgetragen.

Abkürzungen: RFI – relative Fluoreszenzintensität, AU – willkürliche Einheiten (*arbitrary units*), p – phospho, ac – acetyl, cl – gespalten (*cleaved*), me1 – monomethyl, me2 – dimethyl, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten

Sehr auffällig war die starke Signalzunahme von Apoptosemarkern nach 6-stündiger Behandlung mit C1 in hoher Konzentration, wohingegen die niedrige Konzentration keinen Effekt hatte. Die gespaltene, aktive Form der Initiatorcaspase 8 stieg ab 6 h stark an, ebenso die der Effektorcaspase 3. Durch diese aktivierte Caspasekaskade wurden weitere Proteine, wie PARP, aktiviert und in ihre gespaltene Form überführt.

Des Weiteren wurden im Akt-Signalweg beteiligte Proteine von der Behandlung mit C1 beeinflusst, auch hier vor allem durch die hohe Konzentration. Die Phosphorylierung von Akt an Threonin 308 erreichte bei 6 h ein Maximum und fiel dann bis 48 h drastisch ab. Ein ähnliches Verhalten zeigte die Phosphorylierung von GSK3 β an Serin 9 und die von mTOR an Serin 2448, welche beide von Akt phosphoryliert werden. Bei mTOR war das Maximum schwächer ausgeprägt und zum 2 h-Zeitpunkt hin verschoben. MDM2, ein weiteres Zielprotein von Akt, lag ab 24 h an Serin 166 verringert phosphoryliert vor.

Die Phosphorylierung des Tumorsuppressor Rb (S807/S811) sank bei beiden Behandlungskonzentrationen zum 24 h-Wert hin abrupt ab und stieg bis 48 h wieder auf das DMSO-Kontrollniveau an. Beide Effekte waren bei geringer Dosierung weniger stark ausgeprägt.

Die Expression des Transkriptionsfaktors und Stammzellmarkers SOX-2 sank bereits 2 h nach Behandlung mit C1 in $10 \times IC_{50}$ drastisch ab. Ein Anstieg der Expression der Histon-Acetyltransferase GCN5L2 wurde 24 h nach Behandlung mit C1 deutlich. Eine verringerte Phosphorylierung ab 24 h konnte beim Transkriptionsfaktor Smad2 (S245p/S250p/S255p) beobachtet werden. Die Phosphorylierung von Zytokeratin 8 an Serin 23 wurde durch C1 in geringer Dosierung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle verstärkt.

4.3.1.3 Wirkprofil von C2 auf Sphäroide der Zelllinie NCCIT

Die Ergebnisse der Expressions- und Modifikationsanalyse von NCCIT-Sphäroiden nach Behandlung mit dem proprietären HDACi C2 mittels RPPA sind in Abbildung 16 dargestellt. Die Signalwerte wurden jeweils auf die im Mikrosport immobilisierte Proteinmenge normiert und auf den Mittelwert der entsprechenden DMSO-Kontrollgruppe bezogen. Die zur Basis 2 logarithmierten Verhältnisse zwischen Behandlung mit C2 und DMSO sind in der *Heatmap* dargestellt, wobei durch das angewandte Clusterverfahren ähnlich regulierte Proteine nebeneinander zu liegen kommen.

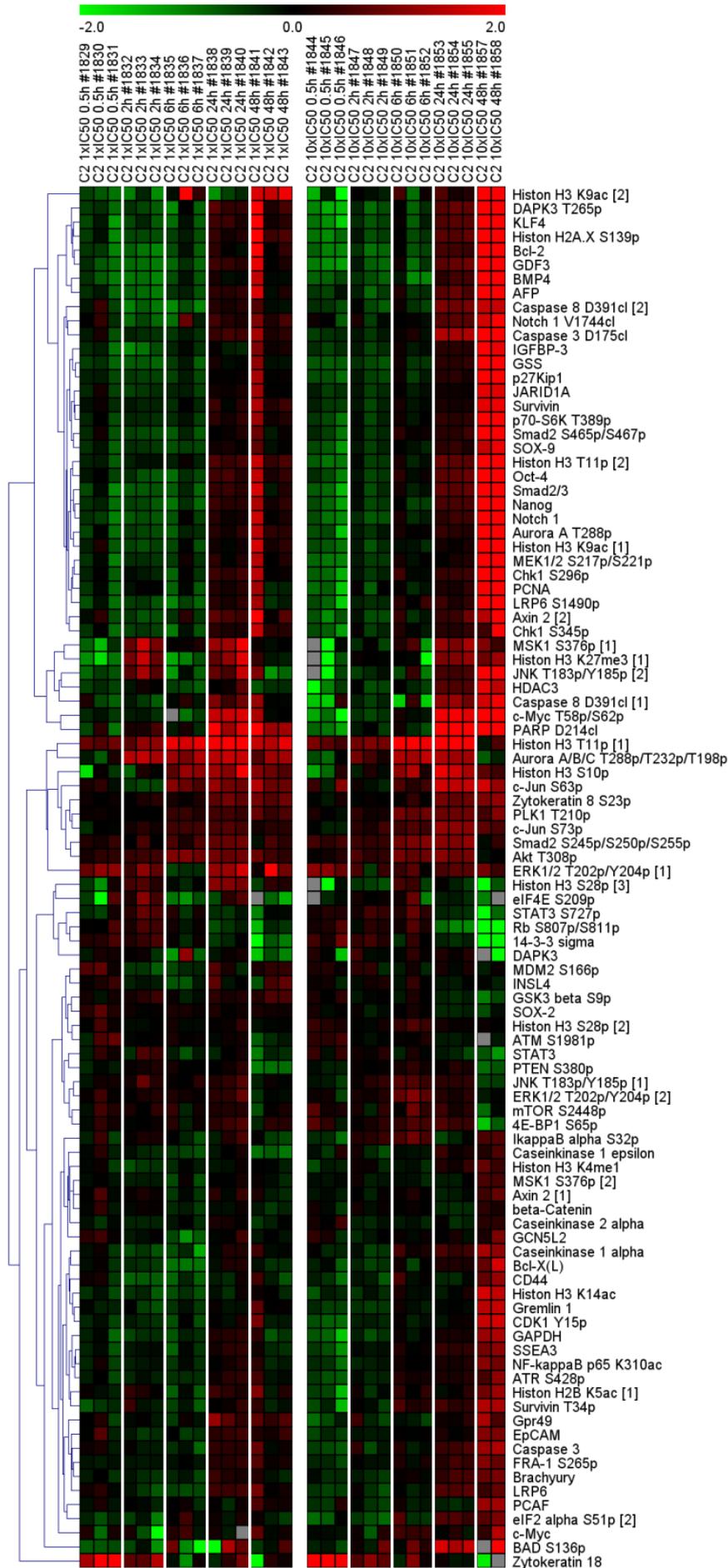


Abbildung 16: Änderungen im Modifikations- und Expressionszustand von Proteinen durch Behandlung von NCCIT-Sphäroiden mit C2

Die Expression bzw. Modifikation von Proteinen in NCCIT-Sphäroiden wurde nach Behandlung mit dem HDACi C2 mittels RPPA analysiert. In der *Heatmap* ist das Verhältnis zwischen Behandlung mit C2 und DMSO dargestellt, wobei jeder Signalwert der C2-Behandlung auf den zeitlich entsprechenden Mittelwert der DMSO-Kontrollen normalisiert und zur Basis 2 logarithmiert wurde. Die Ergebnisse sind nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) entsprechend der Farbkodierung dargestellt. Rot bedeutet eine durch C2 erhöhte, grün eine erniedrigte Expression bzw. Modifikation der Proteine, graue Felder entsprechen nicht erfassten Werten. Die einzelnen Proben sind senkrecht, die analysierten Proteine waagrecht aufgetragen.

Abkürzungen: # - eindeutiger Probenbezeichner, p – phospho, ac – acetyl, cl – gespalten (*cleaved*), me1 – monomethyl, me2 – dimethyl, me3 – trimethyl, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten

Bei den Caspasen sowie bei PARP konnte ab 24 h eine verstärkte Spaltung detektiert werden. Außerdem wurden Effekte deutlich, die ab 6 h Behandlungszeit auftraten und bis 48 h wieder abfielen. Beispiele hierfür sind Histon H3 T11p [1] und Aurora A/B/C T288p/T232p/T198p. Andere Proteine wurden ab 48 h Behandlungszeit stark nach unten reguliert, wie beispielsweise Rb S807p/S811p und 14-3-3 σ .

Alle Effekte wurden anhand von Zeitverlaufdiagrammen betrachtet (Abbildung 18). Proteine deren Effekte anhand der Zeitverläufe bestätigt werden konnten, sind in Abbildung 17 in einer *Heatmap* aufgetragen. Alle Effekte auf Histone werden in 4.3.3 separat behandelt.

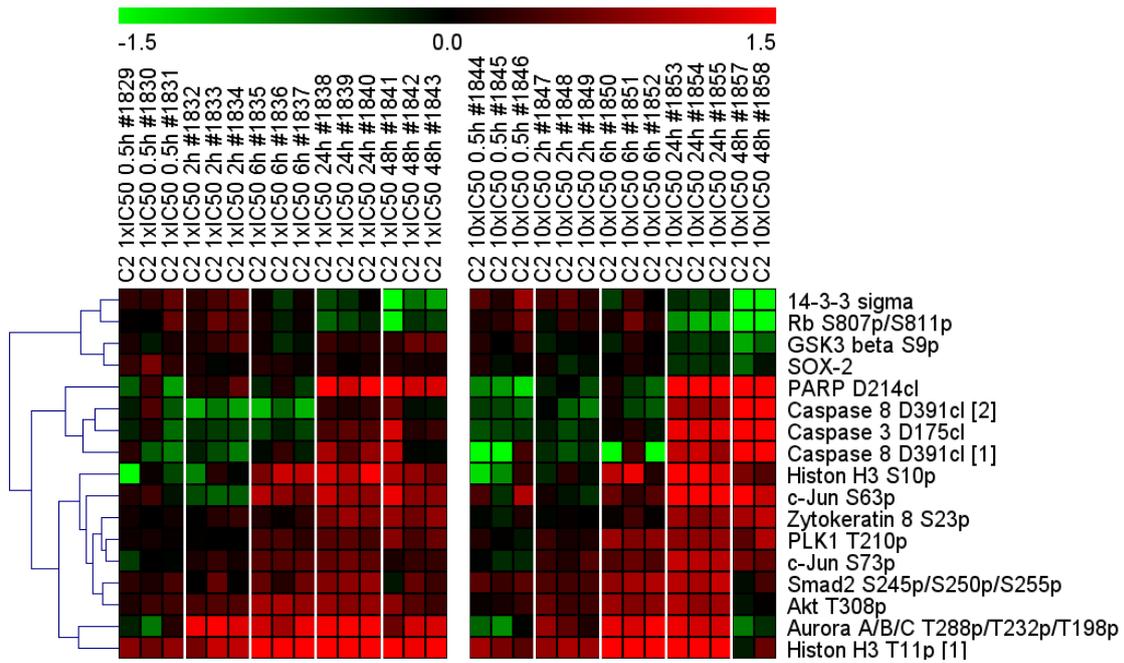


Abbildung 17: Modifikations- und Expressionsstatus differenziell regulierter Proteine nach Behandlung von NCCIT-Sphäroiden mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor C2

Die Expression bzw. Modifikation von Proteinen in NCCIT-Sphäroiden wurde nach Behandlung mit dem HDACi C2 mittels RPPA analysiert. In der *Heatmap* ist das Verhältnis zwischen Behandlung mit C2 und DMSO dargestellt, wobei jeder Signalwert der C2-Behandlung auf den zeitlich entsprechenden Mittelwert der DMSO-Kontrollen normalisiert und zur Basis 2 logarithmiert wurde. Die Signalwerte sind nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) entsprechend der Farbkodierung dargestellt. Rot bedeutet eine durch C2 erhöhte, grün eine erniedrigte Expression bzw. Modifikation der Proteine, graue Felder entsprechen nicht erfassten Werten. Die einzelnen Proben sind senkrecht, die analysierten Proteine waagrecht aufgetragen.

Die Proteine wurden anhand der Zeitverlaufdiagramme ausgewählt, alle deutlich differenziell exprimierten bzw. modifizierten Proteine sind dargestellt.

Abkürzungen: # - eindeutiger Probenbezeichner, p – phospho, ac – acetyl, cl – gespalten (*cleaved*), me1 – monomethyl, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten

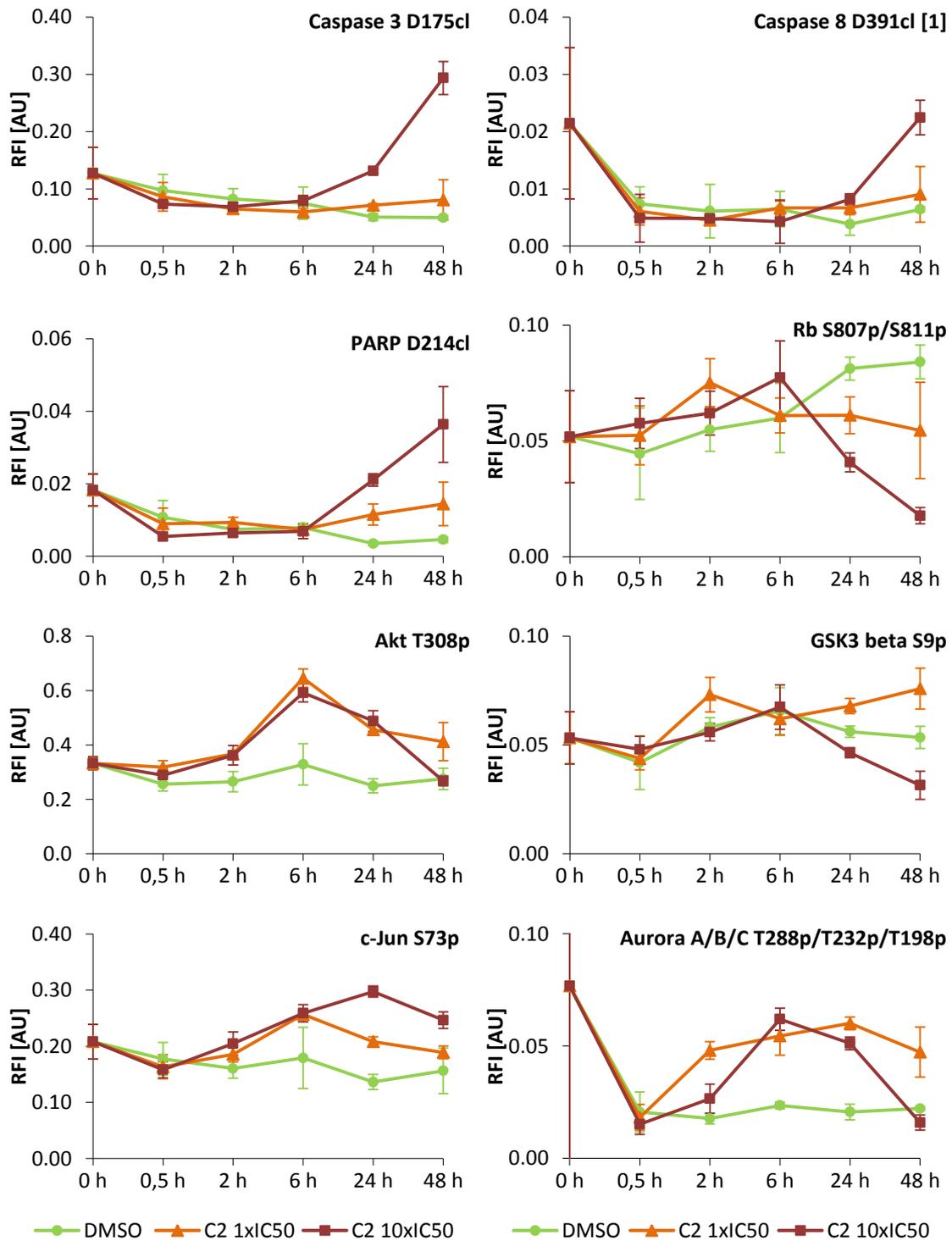


Abbildung 18: Zeitverlauf der Expression und Modifikation ausgewählter Proteine nach Behandlung von NCCIT-Sphäroiden mit C2

NCCIT-Sphäroide wurden in drei Replikaten mit den angegebenen Konzentrationen ($1 \times IC_{50}$, $10 \times IC_{50}$) der Substanz C2 behandelt. Als Lösungsmittelkontrolle diente 0,1 % DMSO (je 2-4 Replikate). Der Expressions- und Modifikationsstatus von 81 Proteinen wurde mittels RPPA analysiert. Die Signalwerte wurden auf die immobilisierte Proteinmenge normiert. Die Mittelwerte der Replikate einiger differenziell exprimierter bzw. modifizierter Proteine sind mit zugehöriger Standardabweichung aufgetragen.

Abkürzungen: RFI – relative Fluoreszenzintensität, AU – willkürliche Einheiten (*arbitrary units*), p – phospho, ac – acetyl, cl – gespalten (*cleaved*), me1 – monomethyl, me2 – dimethyl, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten

Auch durch Behandlung mit C2 wurden Apoptosemarker verstärkt aktiviert. Ausgehend von der Initiatorcaspase 8 über die Effektorcaspase 3, bis hin zu Zielproteinen wie PARP, nahm die Aktivität, gemessen an den gespaltenen Formen, ab 24 h deutlich zu. Die Effekte wurden bei hoher Dosierung von C2 besonders deutlich.

Akt zeigte einen Anstieg der Phosphorylierung an Threonin 308 mit einem Maximum bei 6 h und anschließendem Abfall auf das Nullniveau, welches bei 48 h erreicht wurde. Die Akt-abhängige Phosphorylierung von GSK3 β (S9) zeigte bei hoher Dosierung ebenfalls einen Abfall zwischen 6 h und 48 h. Der Phosphorylierungsstatus von mTOR (S2448) und MDM2 (S166) blieb unverändert.

Sehr stark durch C2 beeinflusst zeigte sich der Transkriptionsfaktor c-Jun, dessen Phosphorylierung an Serin 63 und Serin 73 ab 30 min anstieg, wobei ein Maximum bei 24 h erreicht wurde. Dieser Effekt wurde konzentrationsabhängig verstärkt. Die für die Phosphorylierung verantwortliche Kinase JNK zeigte durch C2 keine veränderte Aktivität.

Eine essentielle Funktion in Bezug auf den Zellzyklus besitzt Rb, ein Tumorsuppressorprotein, welches im phosphorylierten Zustand zum Fortschreiten des Zellzyklus beiträgt. Auch bei Rb wurde bei 6 h eine maximale Phosphorylierung detektiert, mit einem Abfall hin zum 48 h-Zeitpunkt.

Die Kinasen Aurora A/B/C und PLK1 besitzen Einfluss auf Zellzyklus und Mitose und zeigten bei beiden Behandlungskonzentrationen einen parallelen Verlauf ihrer Phosphorylierung, welche ab 2 h erhöht war und bei 6 h ein Maximum erreichte.

Die Expression des Stammzellmarkers SOX-2 nahm ab 24 h leicht ab. Die Phosphorylierung von Smad2 (S245p/S250p/S255p) stieg bereits ab 30 min an, mit einer maximalen Phosphorylierung bei 24 h. Bei der Phosphorylierung von Zytokeratin 8 an Serin 23 wurde durch beide Konzentrationen ab 6 h ein Anstieg detektiert.

4.3.2 Wirkung der Antitumorsubstanzen C1, C2 und C5 auf Sphäroide der Zelllinie HT-29

Der Expressions- und Modifikationszustand von Proteinen in Sphäroiden der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 nach Behandlung mit Antitumorsubstanzen wurde mittels RPPA analysiert. Die proprietären HDACi C1 und C2 sowie der Kinesin-Inhibitor C5 wurden in den Konzentrationen 10xIC₅₀ und 100xIC₅₀ (bestimmt auf HT-29-Monolayerzellen) eingesetzt und für 46 h inkubiert. Als Kontrolle dienten mit DMSO-behandelte Sphäroide. Pro Behandlungsbedingung wurden 9 Sphäroide individuell

behandelt, bei der Sphäroidernte wurden jeweils 3 Sphäroide vereinigt, wodurch 3 biologische Replikate entstanden, von der DMSO-Kontrolle wurden 5 Replikate hergestellt. Insgesamt wurden 135 Modifikationszustände von 75 Proteinen analysiert. Wurde ein Protein in seiner modifizierten und unmodifizierten Form analysiert, so wurde hieraus das Verhältnis gebildet, welches als indirektes Maß für die relative Aktivität des Proteins gilt.

Bei manchen Mikroarrays, welche der Korrektur um Primärantikörper-unspezifische Effekte dienten, war durch Störungen in den Referenzsignalen eine positionsbedingte Korrektur erschwert. Um artifizielle Effekte zu verhindern, wurden die betroffenen Referenzsignale entweder rechnerisch korrigiert oder es wurde auf eine Korrektur um Primärantikörper-unspezifische Effekte verzichtet.

4.3.2.1 Einfluss der Antitumorsubstanzen auf den Proteinstatus der Sphäroide

Der Einfluss der Substanzen C1, C2 und C5 auf den Proteingehalt der Sphäroide wurde analysiert (Abbildung 19).

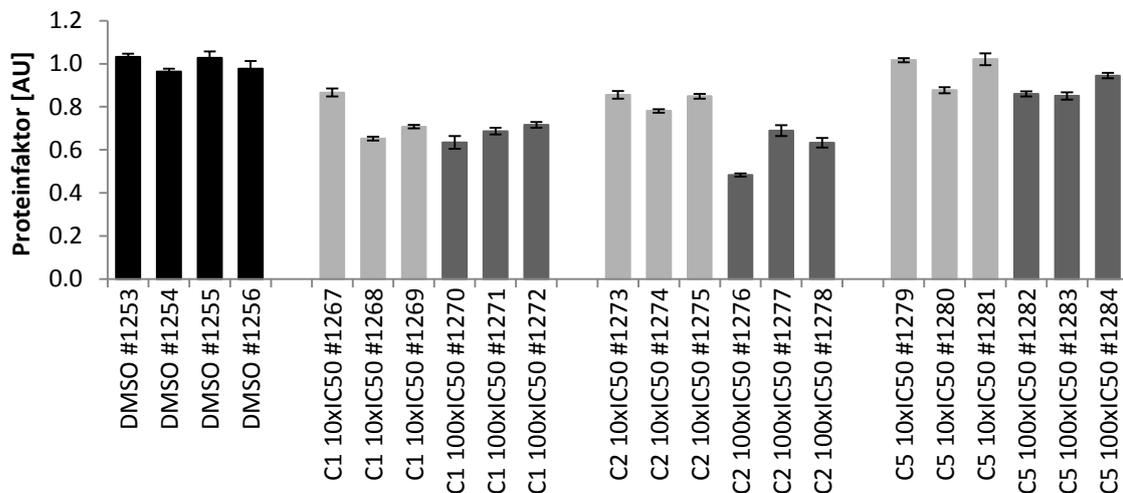


Abbildung 19: Proteingehalt der HT-29-Sphäroide nach Behandlung mit den proprietären Leitstrukturen C1, C2 und C5 im Vergleich zur DMSO-Kontrollbehandlung

HT-29-Sphäroide wurden in drei Replikaten für 46 h mit den angegebenen Konzentrationen (10xIC₅₀, 100xIC₅₀) der Substanzen C1, C2 oder C5 behandelt. Als Lösungsmittelkontrolle diente 0,2 % DMSO (4 Replikate). Aus der auf dem Mikroarray-Chip immobilisierten Proteinmenge wurden Proteinfaktoren berechnet, welche auf den Zeitnullpunkt normiert wurden. Die Mittelwerte der biologischen Replikate sind mit zugehöriger Standardabweichung aufgetragen.

Abkürzungen: AU – willkürliche Einheiten (*arbitrary units*), # - eindeutiger Probenbezeichner

Die behandelten Sphäroide zeigten, abhängig von der Behandlungskonzentration, kleinere Proteinfaktoren als die DMSO-Kontrollen. Deutlich wurde dieser Effekt bei C1

und C2, wo die Proteinmenge durch Behandlung um 20-40 % abfiel. Die Behandlung mit C5 hatte nur in hoher Dosierung eine Reduktion der Proteinmenge um 10 % zur Folge.

Um den Expressions- und Modifikationsstatus von Proteinen zu analysieren, wurde eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt. Dadurch können ähnlich regulierte Proteine sowie Proben mit ähnlichem Regulationsmuster in einer *Heatmap* nebeneinander dargestellt werden. Die um Primärantikörper-unspezifische Effekte und die immobilisierte Proteinmenge korrigierten Signalwerte der RPPA-Analyse wurden auf den Mittelwert der DMSO-Kontrollgruppe zentriert und zur Basis 2 logarithmiert (Abbildung 20).

Die Expressions- und Modifikationsmuster der mit C1 und C5 behandelten Sphäroide unterscheiden sich stark, weshalb diese Probengruppen durch die Clusteranalyse strikt in zwei Gruppen getrennt wurden. Besonders interessant erscheint die Verteilung der mit C2 behandelten Proben. Während die mit C2 in hoher Dosierung behandelten Proben durch die Clusteranalyse nahe den C1-behandelten Proben auftauchten, kamen die mit C2 in niedriger Dosierung behandelten Proben nahe den C5-behandelten Proben zu liegen. Die Behandlungskonzentration scheint somit die Wirkung von C2 stark zu beeinflussen.

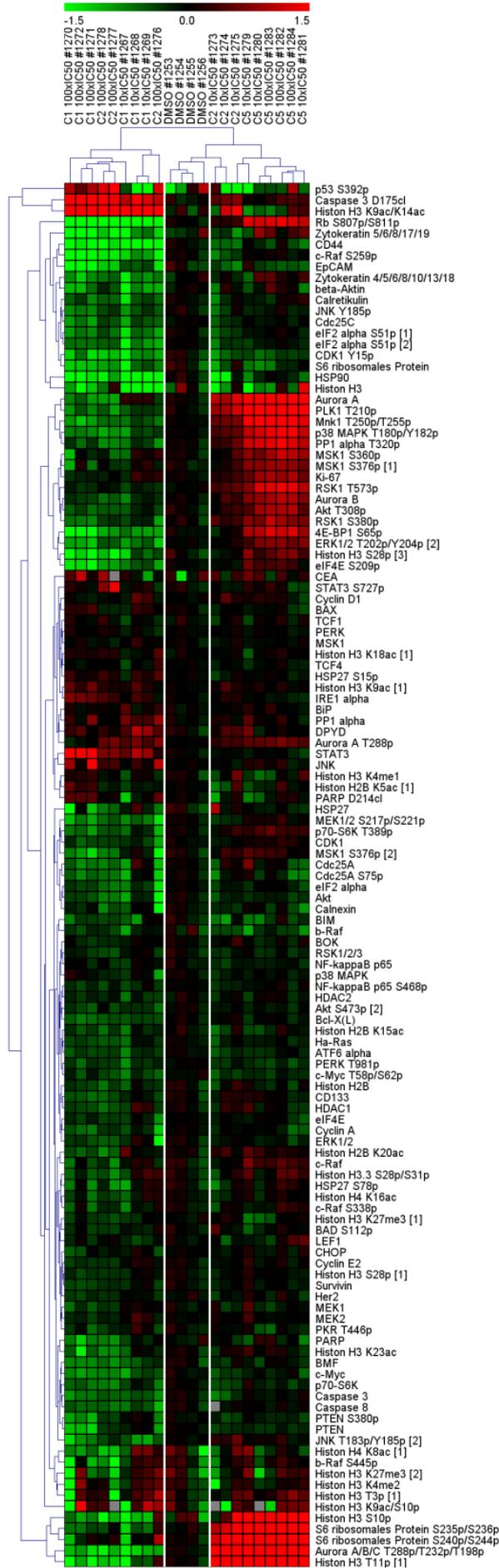


Abbildung 20: Änderungen im Modifikations- und Expressionszustand von Proteinen durch Behandlung von HT-29-Sphäroiden mit C1, C2 und C5

Die Expression bzw. Modifikation von Proteinen in HT-29-Sphäroiden wurde nach Behandlung mit den Antitumorsubstanzen C1, C2 und C5 mittels RPPA analysiert. Die Signalwerte wurden auf den Mittelwert der DMSO-Kontrollen normalisiert und zur Basis 2 logarithmiert. Die Ergebnisse sind nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) entsprechend der Farbkodierung dargestellt. Rot bedeutet eine erhöhte, grün eine erniedrigte Expression bzw. Modifikation der Proteine, graue Felder entsprechen nicht erfassten Werten. Die einzelnen Proben sind senkrecht, die analysierten Proteine waagrecht aufgetragen

Abkürzungen: # - eindeutiger Probenbezeichner, p – phospho, ac – acetyl, cl – gespalten (*cleaved*), me1 – monomethyl, me2 – dimethyl, me3 – trimethyl, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten

4.3.2.2 Wirkprofil von C1 auf Sphäroide der Zelllinie HT-29

Um Proteinexpression und -modifikation in den mit dem HDACi C1 behandelten HT-29-Sphäroide zu analysieren, wurden für alle Analyten die faktoriellen Veränderungen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle bestimmt. Hierfür wurden die einzelnen Signalwerte durch den Mittelwert der DMSO-Kontrollen dividiert und so das Verhältnis von DMSO-Kontrolle zu Behandlung bestimmt. Näher betrachtet werden im Folgenden alle Proteine, deren Expression oder Modifikation sich mindestens um den Faktor 3/2 erhöhte bzw. 2/3 reduzierte (Tabelle 15). Diese sind nach hierarchischer Clusteranalyse in Abbildung 21 dargestellt. Alle mit * markierten Proteine, wurden durch Welch-T-Test als signifikant unterschiedlich reguliert klassifiziert (Bonferroni-Korrektur, $p < 0,05$).

Tabelle 15 Faktoren der Änderungen des Modifikations- und Expressionszustands von Proteinen durch Behandlung von HT-29-Sphäroiden mit C1

Die Expression bzw. Modifikation von Proteinen in HT-29-Sphäroiden wurde nach Behandlung mit dem HDACi C1 mittels RPPA analysiert. Die Signalwerte wurden auf den Mittelwert der DMSO-Kontrollen normalisiert und zur Basis 2 logarithmiert. Von allen Analyten, die mindestens eine Erhöhung um Faktor 3/2 (dunkelgrau) bzw. eine Erniedrigung um Faktor 2/3 (hellgrau) erfuhren, sind Mittelwerte der Replikate mit Standardabweichung dargestellt. Für alle nach Welch-T-Test (Bonferroni-Korrektur, $p < 0,05$) als signifikant klassifizierte Analyten sind die p Werte gelistet

Abkürzungen: SD – Standardabweichung, CV – Variationskoeffizient, p – phospho, ac – acetyl, cl – gespalten (*cleaved*), me1 – monomethyl, me2 – dimethyl, me3 – trimethyl, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten, R – relative Aktivität des Proteins, entspricht dem Verhältnis von modifizierter Form zur Gesamtform

	C1 10xIC50				C1 100xIC50			
	Faktor	SD	% CV	p-Wert	Faktor	SD	% CV	p-Wert
4E-BP1 S65p	0,558	0,053	9,5		0,326	0,032	9,7	
Aurora A	1,209	0,013	1,1		0,598	0,072	12,0	
Aurora A T288p R	1,158	0,107	9,2		1,548	0,242	15,6	
Aurora A/B/C T288p/T232p/T198p	0,423	0,049	11,6		0,463	0,055	11,9	
Aurora A/B/C T288p/T232p/T198p R(A)	0,348	0,044	12,5	* 0,025	0,770	0,015	2,0	
Aurora A/B/C T288p/T232p/T198p R(B)	0,556	0,059	10,6		0,585	0,066	11,3	
Bcl-X(L)	0,747	0,033	4,4		0,642	0,036	5,6	
beta-Aktin	0,453	0,132	29,2		0,520	0,081	15,6	
BMF	0,710	0,067	9,5		0,567	0,006	1,0	
Calretikulin	0,625	0,169	27,1		0,678	0,093	13,7	
Caspase 3	0,698	0,032	4,6		0,588	0,035	5,9	
Caspase 3 D175cl	2,483	0,311	12,5		4,729	0,235	5,0	
Caspase 3 D175cl R	3,461	0,278	8,0		7,862	0,411	5,2	
CD44	0,295	0,012	4,0		0,295	0,069	23,4	
Cdc25A	0,965	0,340	35,2		0,623	0,060	9,6	
Cdc25A S75p	0,818	0,244	29,8		0,644	0,057	8,8	
Cdc25C	0,658	0,120	18,3		0,552	0,053	9,6	
CDK1 Y15p	0,502	0,096	19,1		0,483	0,106	21,9	
CDK1 Y15p R	0,620	0,134	21,6		0,662	0,213	32,2	
c-Myc	0,662	0,124	18,8		0,549	0,026	4,8	
c-Myc T58p/S62p R	1,102	0,120	10,9		1,513	0,120	7,9	
c-Raf S259p	0,496	0,062	12,5		0,234	0,007	2,9	
c-Raf S259p R	0,446	0,018	4,1		0,300	0,052	17,3	
Cyclin A	0,830	0,089	10,8		0,659	0,052	7,8	
DPYD	1,772	0,298	16,8		1,232	0,160	13,0	
eIF2 alpha S51p [1]	0,561	0,121	21,5		0,570	0,043	7,5	
eIF2 alpha S51p [2]	0,501	0,111	22,2		0,628	0,001	0,2	
eIF4E S209p	0,680	0,068	9,9		0,358	0,056	15,5	
eIF4E S209p R	0,766	0,066	8,6		0,429	0,089	20,8	
EpCAM	0,729	0,034	4,6		0,269	0,060	22,2	
ERK1/2 T202p/Y204p [2]	0,616	0,075	12,1		0,485	0,030	6,3	* 0,028
ERK1/2 T202p/Y204p [2] R	0,606	0,065	10,7		0,612	0,013	2,2	
Histon H2B K5ac [1] R	0,992	0,104	10,5		1,620	0,115	7,1	
Histon H3	0,174	0,013	7,2		0,404	0,109	26,9	
Histon H3 K9ac/K14ac	5,051	0,281	5,6		8,823	0,262	3,0	* 0,010
Histon H3 S28p [3]	0,610	0,155	25,4		0,367	0,041	11,1	
Histon H3 T11p [1]	0,596	0,175	29,4		0,315	0,153	48,5	
HSP90	0,298	0,044	14,9		0,339	0,056	16,4	
IRE1 alpha	1,179	0,143	12,1		1,615	0,083	5,1	
JNK	1,107	0,125	11,3		1,997	0,802	40,2	
JNK Y185p	0,691	0,116	16,8		0,584	0,020	3,4	
JNK Y185p R	0,626	0,105	16,8		0,354	0,163	46,1	
MEK1/2 S217p/S221p	0,617	0,049	7,9		0,521	0,066	12,7	
MEK1/2 S217p/S221p R(1)	0,574	0,032	5,6		0,708	0,004	0,5	
MEK1/2 S217p/S221p R(2)	0,525	0,026	4,9		0,620	0,062	10,0	
Mnk1 T250p/T255p	0,702	0,067	9,5		0,497	0,040	8,1	* 0,041
MSK1 S376p [2]	0,962	0,111	11,5		0,504	0,080	16,0	
MSK1 S376p [2] R	0,886	0,026	2,9		0,503	0,073	14,6	
p38 MAPK T180p/Y182p	0,675	0,114	16,9		0,586	0,018	3,1	
p38 MAPK T180p/Y182p R	0,712	0,041	5,7		0,553	0,039	7,1	* 0,047
p70-S6K	0,853	0,088	10,3		0,658	0,042	6,3	
p70-S6K T389p	0,802	0,122	15,2		0,600	0,059	9,8	
PARP	0,850	0,090	10,5		0,540	0,078	14,5	
PARP D214cl R	0,890	0,256	28,8		2,634	0,406	15,4	
PLK1 T210p	0,767	0,061	8,0		0,612	0,074	12,0	
PP1 alpha T320p R	0,531	0,112	21,2		0,600	0,090	15,0	
PTEN	0,975	0,071	7,3		0,445	0,024	5,4	* 0,036
PTEN S380p	1,021	0,065	6,4		0,524	0,045	8,6	
Rb S807p/S811p	0,122	0,011	9,2		0,149	0,017	11,2	
RSK1 S380p	0,835	0,066	7,9		0,602	0,024	4,0	
S6 ribosomales Protein	0,560	0,195	34,9		0,441	0,012	2,7	
S6 ribosomales Protein S235p/S236p	0,592	0,134	22,7		0,670	0,068	10,1	
STAT3	1,807	0,256	14,2		2,791	0,050	1,8	* 0,002
Zytokeratin 4/5/6/8/10/13/18	0,507	0,099	19,5		0,519	0,063	12,1	
Zytokeratin 5/6/8/17/19	0,488	0,152	31,0		0,140	0,043	30,6	

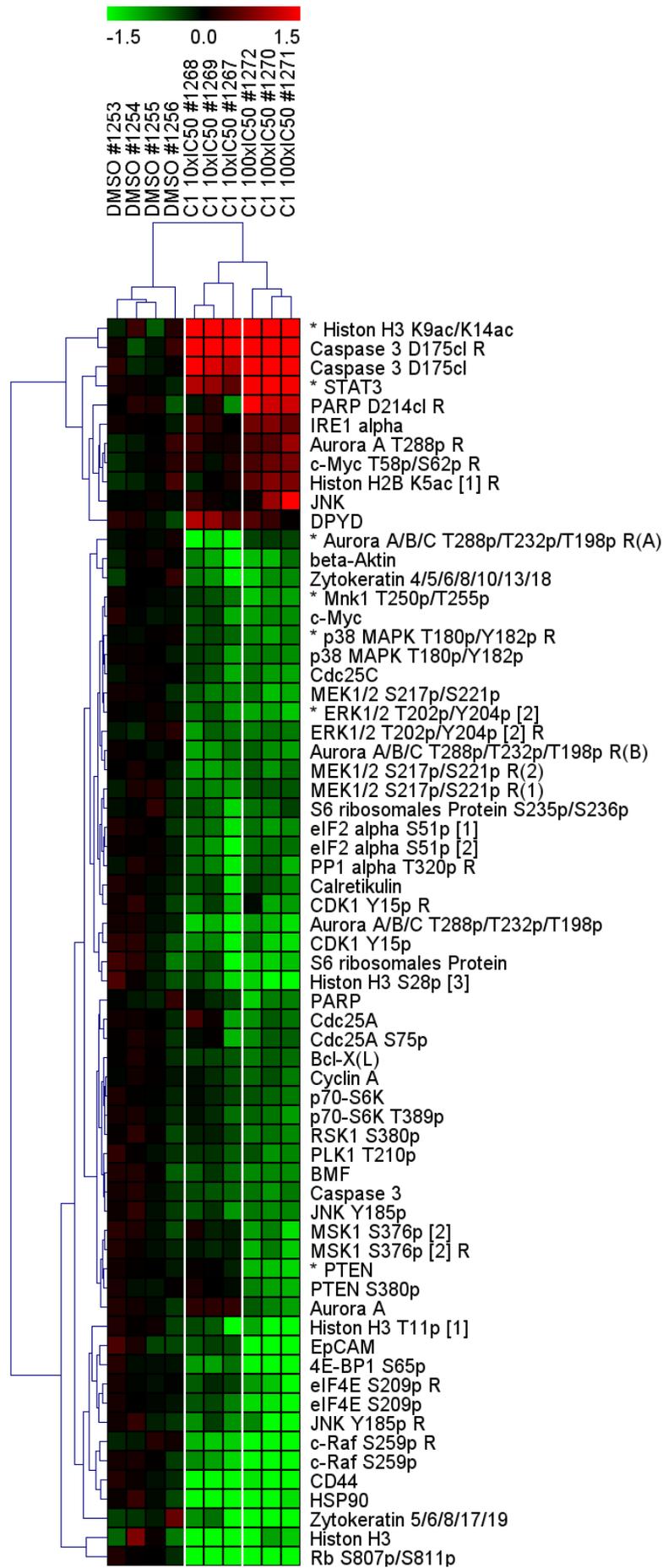


Abbildung 21: Änderungen im Modifikations- und Expressionszustand von Proteinen durch Behandlung von HT-29-Sphäroiden mit C1

Die Expression bzw. Modifikation von Proteinen in HT-29-Sphäroiden wurde nach Behandlung mit dem HDACi C1 mittels RPPA analysiert. Die Signalwerte wurden auf den Mittelwert der DMSO-Kontrollen normalisiert und zur Basis 2 logarithmiert. Die Ergebnisse sind nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) entsprechend der Farbkodierung dargestellt. Rot bedeutet eine erhöhte, grün eine erniedrigte Expression bzw. Modifikation der Proteine, graue Felder entsprechen nicht erfassten Werten. Die einzelnen Proben sind senkrecht, die analysierten Proteine waagrecht aufgetragen

Abkürzungen: # - eindeutiger Probenbezeichner, p – phospho, ac – acetyl, cl – gespalten (*cleaved*), me1 – monomethyl, me2 – dimethyl, me3 – trimethyl, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten, R – relative Aktivität des Proteins, entspricht dem Verhältnis von modifizierter Form zur Gesamtform

Die Proben wurden durch die Clusteranalyse den drei Behandlungsgruppen korrekt zugeordnet. Der Anti- β -Aktin-Antikörper zeigte in den mit C1 behandelten Sphäroiden ein verringertes Signal im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Eigentlich sollte das β -Aktin-Signal dem Signal an Gesamtprotein entsprechen und somit konstant bleiben. Dieses Verhalten konnte im Western Blot (Abbildung 30) beobachtet werden, nicht aber im RPPA. Wahrscheinlich sind Interferenzen des Anti- β -Aktin-Antikörpers mit der RPPA-Plattform für diesen artifiziellen Effekt verantwortlich.

Betrachtet man den starken Anstieg der aktiven Formen von Caspase 3 und ihrem Zielprotein PARP, so deutet dies auf eine erhöhte Apoptoserate, bedingt durch C1, hin. Durch C1 in hoher Konzentration wurde außerdem die Gesamtmenge von Caspase 3 und PARP reprimiert. Die relativen Aktivitäten, welche durch das Verhältnis der modifizierten zur unmodifizierten Form dargestellt werden, wurden entsprechend verstärkt. Während eine Spaltung von Caspase 3 bei beiden Konzentrationen zu beobachten war, wurde PARP nur durch C1 in 100xIC₅₀ verstärkt gespalten. Auch die reduzierte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-X(L) durch C1 in 100xIC₅₀, deutet auf eine verstärkte Apoptoserate hin.

Die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2, p38 MAPK und JNK wurde durch C1 erniedrigt. Bei ERK1/2 (T202/Y204) bereits durch 10xIC₅₀, bei p38 MAPK (T180/Y182p) und JNK (Y185) erst durch 100xIC₅₀. Die relative Aktivität von JNK wurde zusätzlich, durch eine verstärkte Expression des Gesamtproteins, reduziert. MEK1/2, die Kinase von ERK1/2, zeigte ebenfalls eine durch C1 verringerte Phosphorylierung. c-Raf, flussaufwärts von MEK1/2, zeigte keine veränderte aktivierende Phosphorylierung an Serin 338, jedoch eine verringerte Phosphorylierung an Serin 259, einer Akt- und AMPK-abhängigen inhibitorischen 14-3-3-Bindestelle.

ERK1/2 und p38 MAPK phosphorylieren Mnk1 (T250/T255) und MSK1 (S376); ERK1/2 phosphoryliert außerdem RSK1 (S380). All diese Phosphorylierungen lagen nach

Behandlung mit C1 in $100 \times IC_{50}$ reduziert vor. Auch weiter flussabwärts zeigte die Mnk1-abhängige Phosphorylierung von eIF4E (S209) bei $100 \times IC_{50}$ diesen Effekt. Die Phosphorylierung von 4E-BP1 (S65), des inhibitorischen Bindeproteins von eIF4E, wurde ebenfalls verringert, was die Inhibition von eIF4E verstärkt.

Auch der Zellzyklus wurde durch Behandlung der HT-29-Sphäroide mit C1 beeinflusst. Eine verringerte Aktivierung der Aurorinasen A/B/C, welche vor allem mitotisch aktiv sind, wurde sichtbar. Zusätzlich wurde die Expression von Aurora A reduziert, was eine verringerte relative Phosphorylierung zur Folge hatte. Die Phosphorylierung von PLK1 (T201), welche durch Aurora A katalysiert wird und zur Aktivierung von Cdc25C führt, nahm durch C1 in $100 \times IC_{50}$ ab. Die Gesamtmenge an Cdc25C wurde ebenfalls reprimiert. Diese Phosphatase ist für die Dephosphorylierung von CDK1 an Serin 15 verantwortlich, trotzdem war die Phosphorylierung von CDK1 reduziert.

PP1 α , welche Rb und Cdc25 dephosphoryliert, wird von CDK1 inhibierend phosphoryliert. Die Behandlung mit C1 hatte eine reduzierte Phosphorylierung von PP1 α (T320) zur Folge. Stark reprimiert wurde auch die Phosphorylierung von Rb (S807/S811), welche für die G0-G1-Transition essentiell ist. Cdc25A ist gemeinsam mit CDK2 für die G1-S-Transition zuständig und wurde durch C1 in $100 \times IC_{50}$ verringert exprimiert und phosphoryliert. Passend dazu nahm die Gesamtmenge an c-Myc ab, was zu einer Erhöhung der relativen Aktivität führte, detektierbar am Phosphorylierungsgrad von Threonin 85 und Serin 62. Die Expression von Cyclin A, welches für den Eintritt in die Mitose benötigt wird, nahm durch C1 in $100 \times IC_{50}$ ebenfalls ab.

IRE1 α wird stressabhängig reguliert und zeigte eine verstärkte Expression durch C1 in $100 \times IC_{50}$. Die Expression der Chaperone HSP90 und Calretikulin nahm durch Behandlung mit C1 ab, ebenso wurde die stressabhängige Phosphorylierung von eIF2 α reduziert.

Die Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 an Serin 235 und Serin 236 wurde durch C1 konzentrationsabhängig reprimiert. Zudem war die Phosphorylierung seiner Kinase p70-S6K an Threonin 389 sowie ihre Expression verringert. Allerdings waren beide Effekte nur schwach ausgeprägt. Weiter flussaufwärts bei Akt konnten keine Veränderungen detektiert werden.

Die Expression des Transkriptionsfaktors STAT3 wurde durch Behandlung mit C1 stark erhöht. Die beiden epithelialen Marker EpCAM und Zytokeratin wurden in ihrer Expression konzentrationsabhängig reprimiert. Die Expression von EpCAM, welches auf fast allen gastrointestinalen Karzinomen exprimiert wird, nahm durch C1 in $100 \times IC_{50}$ stark ab. Auch das Oberflächen-Glykoprotein CD44 wurde in seiner Expression reprimiert. Der

Tumorsuppressor PTEN wurde nach Behandlung mit C1 in $100 \times IC_{50}$ ebenfalls verringert exprimiert und seine Phosphorylierung an Serin 380 reduziert.

4.3.2.3 Wirkprofil von C2 auf Sphäroide der Zelllinie HT-29

HT-29-Sphäroide wurden nach 46-stündiger Behandlung mit dem HDACi C2 mittels RPPA analysiert. Die faktoriellen Änderungen von Proteinexpression und -modifikation wurden im Vergleich zur DMSO-Kontrolle bestimmt, wobei im Folgenden nur Erhöhungen um mindestens 3/2 bzw. Verringerungen um mindestens 2/3 betrachtet werden (Tabelle 16). Nach logarithmischer Transformation wurde eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt, deren Ergebnis in einer *Heatmap* (Abbildung 22) dargestellt ist. Alle nach Welch-T-Test (Bonferroni-Korrektur, $p < 0,05$) signifikant unterschiedlichen Analyten sind mit * markiert.

Tabelle 16 Faktoren der Änderungen im Modifikations- und Expressionszustand von Proteinen durch Behandlung von HT-29-Sphäroiden mit C2

Die Expression bzw. Modifikation von Proteinen in HT-29-Sphäroiden wurde nach Behandlung mit dem proprietären HDACi C2 mittels RPPA analysiert. Die Signalwerte wurden auf den Mittelwert der DMSO-Kontrollen normalisiert und zur Basis 2 logarithmiert. Von allen Analyten, die mindestens eine Erhöhung um Faktor 3/2 (dunkelgrau) bzw. eine Erniedrigung um Faktor 2/3 (hellgrau) erfuhren, sind Mittelwerte der Replikate mit Standardabweichung dargestellt. Für alle nach Welch-T-Test (Bonferroni-Korrektur, $p < 0,05$) als signifikant klassifizierte Analyten sind die p-Werte gelistet

Abkürzungen: SD – Standardabweichung, CV – Variationskoeffizient, p – phospho, ac – acetyl, cl – gespalten (*cleaved*), me1 – monomethyl, me2 – dimethyl, me3 – trimethyl, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten, R – relative Aktivität des Proteins, entspricht dem Verhältnis von modifizierter Form zu Gesamtform

	C2 10xIC ₅₀				C2 100xIC ₅₀			
	Faktor	SD	% CV	p-Wert	Faktor	SD	% CV	p-Wert
4E-BP1 S65p	0,984	0,121	12,3		0,508	0,020	3,9	
Akt	0,824	0,090	11,0		0,495	0,150	30,3	
Aurora A	2,223	0,218	9,8		0,603	0,122	20,2	
Aurora A T288p	1,268	0,053	4,2		1,594	0,070	4,4	
Aurora A T288p R	0,564	0,063	11,2		2,671	0,411	15,4	
Aurora A/B/C T288p/T232p/T198p	3,533	0,419	11,9		0,453	0,060	13,3	
Aurora A/B/C T288p/T232p/T198p R(A)	1,579	0,095	6,0		0,764	0,123	16,1	
Aurora A/B/C T288p/T232p/T198p R(B)	2,935	0,400	13,6		0,628	0,045	7,1	
Calretikulिन	0,816	0,202	24,7		0,662	0,017	2,6	
Caspase 3	0,689	0,110	16,0		0,643	0,062	9,7	
Caspase 3 D175cl	1,567	0,126	8,0		2,580	0,240	9,3	
Caspase 3 D175cl R	2,248	0,174	7,8		3,921	0,027	0,7	* 0,030
Caspase 8	0,995	0,072	7,3		0,585	0,088	15,0	
CD44	0,637	0,019	3,0		0,332	0,068	20,3	
Cdc25A	0,971	0,220	22,6		0,572	0,084	14,6	
Cdc25A S75p	0,842	0,204	24,2		0,561	0,094	16,8	
CDK1 Y15p	0,635	0,097	15,3		0,464	0,027	5,8	
c-Myc	0,754	0,052	6,9		0,627	0,054	8,6	
c-Raf S259p	0,688	0,094	13,6		0,347	0,045	13,1	
c-Raf S259p R	0,678	0,051	7,6		0,479	0,131	27,4	
eIF2 alpha	0,871	0,086	9,9		0,547	0,112	20,5	
eIF2 alpha S51p [1]	0,727	0,078	10,7		0,627	0,104	16,6	
eIF2 alpha S51p [2]	0,732	0,110	15,0		0,620	0,098	15,8	
eIF4E S209p	0,949	0,028	3,0		0,506	0,003	0,7	
EpCAM	0,671	0,090	13,4		0,421	0,024	5,8	
ERK1/2 T202p/Y204p [2]	1,059	0,057	5,4		0,616	0,124	20,2	
Histon H3 K9ac/K14ac	1,963	0,949	48,4		6,881	1,129	16,4	
Histon H3 T11p [1]	7,023	0,471	6,7		0,735	0,423	57,5	
HSP90	0,534	0,279	52,3		0,309	0,198	64,3	
JNK	0,958	0,045	4,7		1,583	0,398	25,1	
MEK1/2 S217p/S221p	0,827	0,033	4,0		0,580	0,141	24,3	
Mnk1 T250p/T255p	1,573	0,066	4,2		0,629	0,015	2,4	
MSK1 S376p [2]	1,152	0,138	12,0		0,498	0,146	29,3	
MSK1 S376p [2] R	1,172	0,129	11,0		0,541	0,173	31,9	
p38 MAPK T180p/Y182p	1,427	0,062	4,3		0,614	0,133	21,7	
p38 MAPK T180p/Y182p R	1,615	0,073	4,5		0,928	0,461	49,6	
p70-S6K	0,742	0,025	3,4		0,587	0,017	2,8	
PARP D214cl R	0,933	0,369	39,5		1,659	0,226	13,6	
PLK1 T210p	2,084	0,240	11,5		0,659	0,106	16,0	
PP1 alpha T320p	1,345	0,143	10,6		0,560	0,016	2,9	
PP1 alpha T320p R	1,275	0,243	19,0		0,475	0,131	27,6	
Rb S807p/S811p	1,209	0,045	3,7		0,130	0,019	14,5	
RSK1 S380p R	1,515	0,146	9,6		0,960	0,218	22,7	
RSK1 T573p R	1,557	0,066	4,2		1,173	0,116	9,9	
S6 ribosomales Protein S235p/S236p	2,478	0,315	12,7		0,985	0,205	20,8	
S6 ribosomales Protein S240p/S244p	3,734	1,159	31,0		1,403	0,484	34,5	
STAT3	0,966	0,017	1,8		1,508	0,246	16,3	
Zytokeratin 4/5/6/8/10/13/18	0,919	0,103	11,2		0,637	0,028	4,4	
Zytokeratin 5/6/8/17/19	0,711	0,123	17,2		0,395	0,055	13,9	

Abbildung 22: Änderungen im Modifikations- und Expressionszustand von Proteinen durch Behandlung von HT-29-Sphäroiden mit C2

Die Expression bzw. Modifikation von Proteinen in HT-29-Sphäroiden wurde nach Behandlung mit dem proprietären HDACi C2 mittels RPPA analysiert. Die Signalwerte wurden auf den Mittelwert der DMSO-Kontrollen normalisiert und zur Basis 2 logarithmiert. Die Ergebnisse sind nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) entsprechend der Farbkodierung dargestellt. Rot bedeutet eine erhöhte, grün eine erniedrigte Expression bzw. Modifikation der Proteine, graue Felder entsprechen nicht erfassten Werten. Die einzelnen Proben sind senkrecht, die analysierten Proteine waagrecht aufgetragen

Abkürzungen: # - eindeutiger Probenbezeichner, p – phospho, ac – acetyl, cl – gespalten (*cleaved*), me1 – monomethyl, me2 – dimethyl, me3 – trimethyl, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten, R – relative Aktivität des Proteins, entspricht dem Verhältnis von modifizierter Form zu Gesamtform

Bereits die Clusteranalyse aller behandelten HT-29-Sphäroide (Abbildung 20) zeigte eine starke Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von C2: Während sich die mit C2 in hoher Dosierung behandelten Sphäroide ähnlich den mit C1 behandelten Sphäroiden verhielten, kam es durch Behandlung mit C2 in niedriger Dosierung zu Effekten, die denen von C5 ähnelten (Abbildung 22). Da es sich bei C1 und C2 um HDACi handelt, war eine ähnliche Wirkung zu erwarten, die Ähnlichkeit zum Kinesin-Inhibitor C5 war eher unerwartet.

Neben dem Glykoprotein CD44 wurden vor allem Apoptosemarker durch C2 in beiden Konzentrationen ähnlich reguliert: Die gespaltene Form der Caspase 3 wurde stark erhöht, die Gesamtmenge der Caspasen 3 und 8 reduziert. Die relative Aktivität von PARP nahm durch C2 in hoher Dosierung im Vergleich zum Gesamtprotein zu.

Die Effekte von C2 auf MAPK-Signalwege waren stark konzentrationsabhängig: Während die niedrige Dosierung eine erhöhte Phosphorylierung von p38 MAPK (T180/Y182) bewirkte, führte die hohe Dosierung zum gegenteiligen Effekt.

C2 in $100 \times IC_{50}$ hatte eine verringerte Phosphorylierung von p38 MAPK (T180/Y182) und ERK1/2 (T202/Y204) zur Folge. Flussaufwärts von ERK1/2 nahm die Phosphorylierung von MEK1/2 (S217/S221) ab, flussabwärts kam es zur verringerten Phosphorylierung von MSK1 (S376) und Mnk1 (T250/T255). Diese reprimierenden Effekte von C2 in hoher Konzentration konnten bis zur Mnk1-abhängigen Phosphorylierung von eIF4E (S209) weiterverfolgt werden. Außerdem kam es zur Abnahme der Phosphorylierung an 4E-BP1 (S65), dem inhibitorischen Bindeprotein von eIF4E. Die Effekte auf eIF4E deuten eine reprimierte Proteinsynthese an.

Im Gegensatz dazu wurde durch C2 in $10 \times IC_{50}$ ein Anstieg der Phosphorylierung von Mnk1 (T250/T255) detektiert, die Phosphorylierung von eIF4E (S209) und 4E-BP1 (S65) wurde nicht beeinflusst. RSK1 wurde an Serin 380 und Threonin 573 verstärkt phosphoryliert, wobei flussaufwärts bei ERK1/2 keine veränderte Aktivität detektiert werden konnte.

C2 in $100 \times IC_{50}$ bewirkte eine leichte Repression von Akt, ohne Beeinflussung der Aktivität. Akt- oder AMPK-abhängig erfolgt die inhibierende Phosphorylierung von c-Raf (S259), welche ebenfalls reduziert war. Weiter flussabwärts lagen p70-S6K und S6 reprimiert vor. Durch C2 in $10 \times IC_{50}$ wurde S6 an Serin 235, 236, 240 und 244 stark phosphoryliert. Flussaufwärts im Akt-Signalweg wurden keine Effekte detektiert.

Die Aktivität der Aurorakinasen ist unter anderem im Hinblick auf die Mitose interessant und unterschied sich stark zwischen den beiden eingesetzten Konzentrationen von C2.

Durch C2 in $10 \times IC_{50}$ kam es zu einem starken Anstieg der Expression von Aurora A sowie zur Phosphorylierung von Aurora A/B/C (T288/T232/T198). C2 in $100 \times IC_{50}$ hatte hingegen eine verringerte Phosphorylierung von Aurora A/B/C zur Folge. Die Phosphorylierung von Aurora A (T288) war, bei reprimierter Expression, erhöht.

Die Aurora-abhängige Phosphorylierung von PLK1 (T210) zeigte bei C2 in $100 \times IC_{50}$ eine Erniedrigung, bei $10 \times IC_{50}$ eine Erhöhung. Weiter flussabwärts nahm die Phosphorylierung von CDK1 (Y15) durch C2 in beiden Konzentrationen ab. Die verminderte Phosphorylierung von PP1 α (T320), flussabwärts von CDK1, deutet auf eine erhöhte Aktivität dieser Phosphatase durch C2 in $100 \times IC_{50}$ hin. Das zeigte sich auch an der verringerten Phosphorylierung ihrer Substrate Rb (S807/S811) und Cdc25A (S7). Außerdem war die Expression von Cdc25A und c-Myc reprimiert.

Auf die Phosphorylierung von JNK, welche durch Stress-Stimuli erfolgt, zeigte die Behandlung mit C2 keinen Einfluss. Die Expression von JNK wurde aber durch C2 in hoher Konzentration leicht erhöht. Die Menge an eIF2 α sowie die inhibierende Phosphorylierung an Serin 51 nahmen ab. Außerdem wurde die Expression der Chaperone Calretikulin und HSP90 reprimiert. Die epithelialen Marker EpCAM und Zytokeratin wurden ebenfalls in ihrer Expression gehemmt, der Transkriptionsfaktor STAT3 induziert.

4.3.2.4 Wirkprofil von C5 auf Sphäroide der Zelllinie HT-29

Bei C5 handelt es sich um einen Kinesin-Inhibitor, welcher Eg5 und somit die Ausbildung von Mitosespindeln inhibiert. Sphäroide der Zelllinie HT-29 wurden nach 46-stündiger Behandlung auf Veränderungen der Proteinexpression und -modifikation untersucht. Faktorielle Änderungen im Vergleich zur DMSO-Lösungsmittelkontrolle sind nach hierarchischer Clusteranalyse in Abbildung 23 dargestellt. Proteine, die eine veränderte Expression oder Modifikation von mindestens Faktor 3/2 bzw. 2/3 zeigten, werden im Folgenden genauer betrachtet (Tabelle 17). Alle nach Welch-T-Test (Bonferroni-Korrektur, $p < 0,05$) signifikant unterschiedlich regulierten Analyten sind mit * gekennzeichnet.

Tabelle 17 Faktoren der Änderungen im Modifikations- und Expressionszustand von Proteinen durch Behandlung von HT-29-Sphäroiden mit C5

Die Expression bzw. Modifikation von Proteinen in HT-29-Sphäroiden wurde nach Behandlung mit dem Kinesin-Inhibitor C5 mittels RPPA analysiert. Die Signalwerte wurden auf den Mittelwert der DMSO-Kontrollen normalisiert und zur Basis 2 logarithmiert. Von allen Analyten, die mindestens eine Erhöhung um Faktor 3/2 (dunkelgrau) bzw. eine Erniedrigung um Faktor 2/3 (hellgrau) erfuhren, sind Mittelwerte der Replikate mit Standardabweichung dargestellt. Für alle nach Welch-T-Test (Bonferroni-Korrektur, $p < 0,05$) als signifikant klassifizierte Analyten sind die p-Werte gelistet

Abkürzungen: SD – Standardabweichung, CV – Variationskoeffizient, p – phospho, ac – acetyl, cl – gespalten (cleaved), me1 – monomethyl, me2 – dimethyl, me3 – trimethyl, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten, R – relative Aktivität des Proteins, entspricht dem Verhältnis von modifizierter Form zur Gesamtform

	C5 10xIC ₅₀				C5 100xIC ₅₀			
	Faktor	SD	% CV	p-Wert	Faktor	SD	% CV	p-Wert
4E-BP1 S65p	2,012	0,093	4,6		2,475	0,090	3,6	* 0,012
Akt T308p	1,567	0,262	16,7		2,046	0,026	1,3	
Akt T308p R	1,857	0,247	13,3		2,410	0,249	10,3	
Aurora A	4,944	1,042	21,1		4,531	0,278	6,1	
Aurora A T288p	1,433	0,034	2,4		1,569	0,072	4,6	
Aurora A T288p R	0,295	0,055	18,8		0,339	0,005	1,5	
Aurora A/B/C T288p/T232p/T198p	14,819	0,631	4,3		17,049	1,074	6,3	
Aurora A/B/C T288p/T232p/T198p R(A)	3,106	0,610	19,6		3,740	0,064	1,7	* 0,003
Aurora A/B/C T288p/T232p/T198p R(B)	8,576	0,618	7,2		8,247	0,233	2,8	
Aurora B	1,731	0,068	3,9		2,065	0,089	4,3	* 0,038
CDK1 Y15p R	0,684	0,082	11,9		0,652	0,017	2,6	
ERK1/2 T202p/Y204p [2]	1,544	0,185	12,0		1,683	0,102	6,0	
ERK1/2 T202p/Y204p [2] R	1,658	0,266	16,0		1,916	0,110	5,7	
Histon H3 S10p	11,142	8,924	80,1		12,825	4,694	36,6	
Histon H3 S28p [3]	1,420	0,233	16,4		1,602	0,115	7,2	
Histon H3 T11p [1]	15,523	1,432	9,2		19,615	0,263	1,3	* 0,022
Ki-67	1,629	0,175	10,7		1,952	0,078	4,0	* 0,033
Mnk1 T250p/T255p	3,088	0,391	12,6		3,665	0,301	8,2	
MSK1 S360p	1,754	0,128	7,3		2,159	0,165	7,6	
MSK1 S360p R	1,778	0,119	6,7		2,226	0,150	6,7	
MSK1 S376p [1]	1,678	0,081	4,8		1,860	0,047	2,5	
p38 MAPK T180p/Y182p	2,272	0,101	4,4		2,749	0,060	2,2	* 0,001
p38 MAPK T180p/Y182p R	2,402	0,022	0,9	* 0,000	2,951	0,220	7,4	
p70-S6K T389p R	1,312	0,202	15,4		1,632	0,193	11,8	
PLK1 T210p	4,804	0,700	14,6		4,731	0,362	7,6	
PP1 alpha T320p	2,296	0,130	5,7		2,664	0,190	7,1	
PP1 alpha T320p R	2,129	0,387	18,2		2,488	0,096	3,9	* 0,014
Rb S807p/S811p	2,402	0,136	5,6		2,544	0,113	4,4	* 0,020
RSK1 S380p	1,660	0,055	3,3		1,974	0,238	12,1	
RSK1 S380p R	1,832	0,130	7,1		2,274	0,308	13,5	
RSK1 T573p	2,119	0,334	15,8		2,623	0,077	2,9	* 0,023
RSK1 T573p R	2,309	0,578	25,0		2,930	0,204	6,9	
S6 ribosomales Protein S235p/S236p	5,020	0,625	12,4		6,526	0,508	7,8	
S6 ribosomales Protein S235p/S236p R	6,769	1,599	23,6		7,902	0,894	11,3	
S6 ribosomales Protein S240p/S244p	6,283	0,356	5,7		8,887	1,084	12,2	
S6 ribosomales Protein S240p/S244p R	8,732	1,775	20,3		10,967	0,651	5,9	

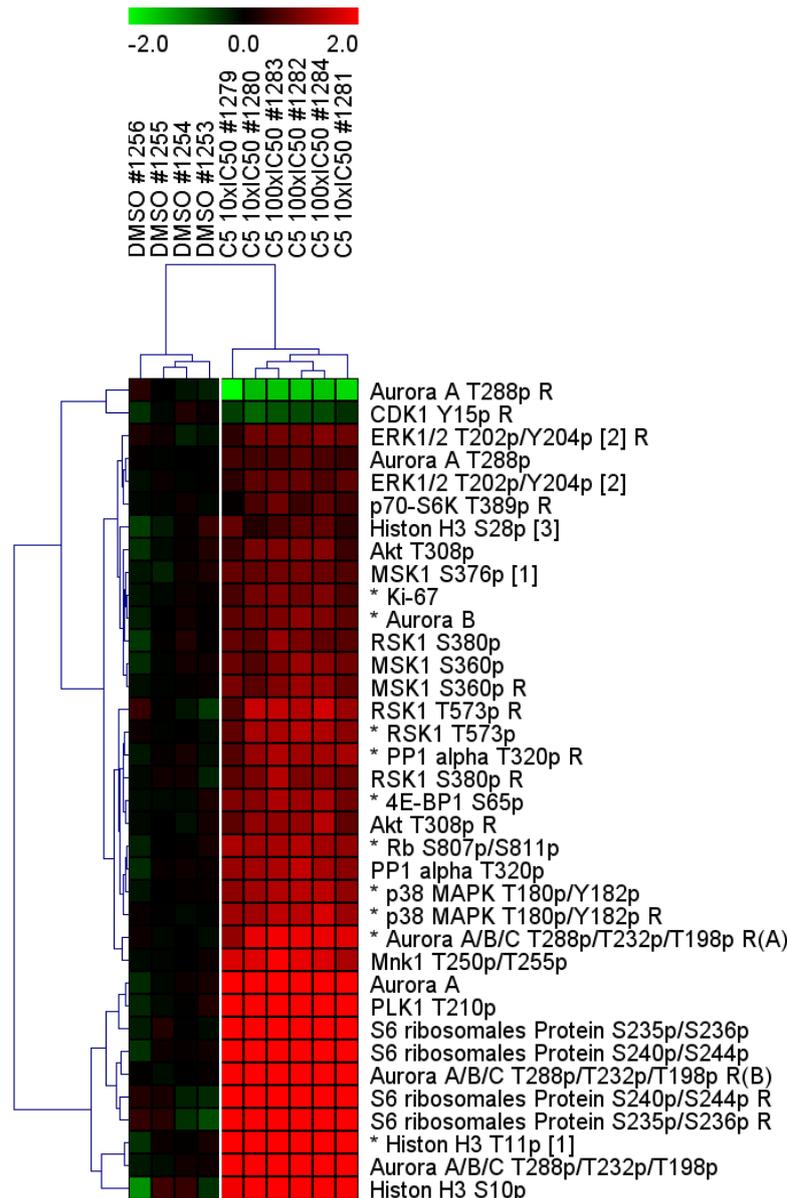


Abbildung 23: Änderungen im Modifikations- und Expressionszustand von Proteinen durch Behandlung von HT-29-Sphäroiden mit C5

Die Expression bzw. Modifikation von Proteinen in HT-29-Sphäroiden wurde nach Behandlung mit dem Kinesin-Inhibitor C5 mittels RPPA analysiert. Die Signalwerte wurden auf den Mittelwert der DMSO-Kontrollen normalisiert und zur Basis 2 logarithmiert. Die Ergebnisse sind nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) entsprechend der Farbkodierung dargestellt. Rot bedeutet eine erhöhte, grün eine erniedrigte Expression bzw. Modifikation der Proteine, graue Felder entsprechen nicht erfassten Werten. Die einzelnen Proben sind senkrecht, die analysierten Proteine waagrecht aufgetragen

Abkürzungen: # - eindeutiger Probenbezeichner, p – phospho, ac – acetyl, cl – gespalten (*cleaved*), me1 – monomethyl, me2 – dimethyl, me3 – trimethyl, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten, R – relative Aktivität des Proteins, entspricht dem Verhältnis von modifizierter Form zur Gesamtform

Auffällig ist, dass der Kinesin-Inhibitor C5 besonders die Phosphorylierung von Proteinen beeinflusste, während die Expression sich nur in wenigen Fällen änderte. Dabei kam es durch C5 meist zu einer erhöhten Phosphorylierung, lediglich die relative

Phosphorylierung von Aurora A (T288) und CDK1 (Y15) nahm im Verhältnis zum Gesamtprotein ab. Der Grad der Änderungen war meist konzentrationsabhängig durch C5 in $10 \times IC_{50}$ geringer als in $100 \times IC_{50}$.

Keinerlei Effekte konnten auf Apoptosemarker beobachtet werden: Weder die Aktivität der Caspasen, noch die von PARP oder Bcl-(X)L wurde durch C5 beeinflusst. Im Gegensatz dazu wurde Ki-67, ein Proliferationsmarker, verstärkt exprimiert.

Auf die Aurorakinasen A/B/C hatte C5 aktivierenden Einfluss, ihr Phosphorylierungsgrad stieg an, ebenso die Expression von Aurora A und B, wodurch die relative Aktivität von Aurora A reduziert wurde. Flussabwärts konnte eine verstärkte Phosphorylierung von PLK1 (T210) beobachtet werden. PLK1 führt wiederum zur verringerten Phosphorylierung von CDK1 (Y15) und somit zu dessen Aktivierung, was auch in dieser Arbeit detektiert werden konnte. Flussabwärts von CDK1 lag die Phosphatase PP1 α an Threonin 320 verstärkt phosphoryliert vor, diese inhibierende Phosphorylierung hemmt die Dephosphorylierung ihrer Substrate Rb und Cdc25. Dies wurde an der verstärkten Phosphorylierung von Rb (S807/S811) sichtbar.

p38 MAPK (T180/Y182) und ERK1/2 (T202/Y204) zeigten eine durch C5 erhöhte Phosphorylierung. Flussabwärts kam es bei Mnk1 (T250/T255), MSK1 (S360/S376) und RSK (S380/T573) zum Anstieg der Phosphorylierung. Eine verstärkte Mnk1-abhängige Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF4E (S209) konnte ebenfalls beobachtet werden. Das inhibitorische Bindeprotein von eIF4E, 4E-BP1, zeigte eine verstärkte Phosphorylierung, was zur Lösung der Bindung an eIF4E führt. Diese Effekte deuten eine erhöhte Translationsinitiation durch C5 an.

Auch Änderungen im Akt-Signalweg konnten detektiert werden. Akt wurde an Serin 308 phosphoryliert und somit aktiviert und die relative Aktivität von p70-S6K wurde verstärkt, da ihre Gesamtexpression leicht reduziert und die Phosphorylierung an Threonin 389 leicht erhöht war. Starke Effekte konnten auf das ribosomale Protein S6 beobachtet werden, dessen Phosphorylierung zunahm (S235/S236/S240/S244).

4.3.3 Wirkung der Antitumorsubstanzen C1, C2 und C5 auf Histonebene

Die Effekte der HDACi C1 und C2 und des Eg5-Inhibitors C5 auf den Modifikationsstatus von Histonen, werden im Folgenden dargestellt. Außerdem wurden alle verwendeten Anti-Histon-Antikörper mittels Peptidarrays auf ihre Spezifität untersucht und die Ergebnisse dieser Charakterisierung werden aufgezeigt.

4.3.3.1 Mikrosphärenbasierte Peptidarrays zur Charakterisierung

modifikationsspezifischer Anti-Histon-Antikörper

Für den Einsatz von Antikörpern im RPPA und die Interpretation der Ergebnisse ist die Spezifität der Antikörper essentiell. Auch ihre Sensitivität ist von Interesse, da sie eine Aussage darüber liefert, ob der Antikörper mit allen verfügbaren spezifischen Proteinen Bindungen eingehen kann oder ob durch Modifikationen im Epitop eine Antikörperbindung verhindert wird. Daher wurden Sensitivität und Spezifität aller in dieser Arbeit verwendeter modifikationsspezifischer Anti-Histon-Antikörper analysiert. Hierfür wurde ein mikrosphärenbasierter Peptidarray verwendet, welcher aus 379 in verschiedenen Kombinationen modifizierten Peptiden besteht (Heubach *et al.* 2013). Die 379 Peptide decken die N-terminalen Schwänze der Histone H2A, H2B, H3 und H4 ab, pro Peptid sind maximal 4 Aminosäuren modifiziert. Somit spiegelt der Peptidarray die häufigsten Histonmodifikationen in verschiedenen Kombinationen wider.

Zur Klassifizierung der Antikörper wurden die 379 Peptide des Arrays für jeden Antikörper in relevante (spezifische Antikörperbindungsstelle vorhanden) und nicht-relevante (keine spezifische Antikörperbindungsstelle vorhanden) unterteilt. Um spezifische Signale vom Hintergrundrauschen abzugrenzen, wurde für jeden Antikörper ein Schwellenwert bestimmt. Hierfür wurde das 99,9 % Quantil der lognormal verteilten, nicht-relevanten Peptidsignale berechnet. Durch den positiven Vorhersagewert PPV (*positive predictive value*) erfolgte die Klassifizierung der Antikörper: Dieses Verfahren war von Hannes Planatscher für Heubach *et al.* (2013) entwickelt worden.

Antikörper mit einem PPV von mindestens 0,6 wurden als spezifisch, Antikörper mit einem PPV von 1,0 als hochspezifisch klassifiziert. Als spezifisch klassifizierte Antikörper zeigten teilweise, zusätzlich zu der vom Hersteller angegebenen Modifikation, Bindung zu einer weiteren definierten Modifikation und ihre Bindungseigenschaften wurden um diese Modifikation erweitert. Waren für einen Antikörper keine relevanten Peptide im Array vertreten oder wurde mit weniger als 3 Peptiden ein Signalwert oberhalb des Schwellenwerts erreicht, so wurde dieser Antikörper nicht klassifiziert (Klasse na).

Von den 42 untersuchten, modifikationsspezifischen Anti-Histon-Antikörpern wurden 20 % als hochspezifisch klassifiziert. 60 % der Antikörper zeigten eine gute Spezifität, die teilweise um eine weitere Modifikation ergänzt werden musste. Diese Antikörper sind somit für den Einsatz im RPPA geeignet. Bei 40 % der Antikörper konnten die Spezifitätsangaben des Herstellers nicht bestätigt werden, entweder zeigten sie keinerlei Spezifität zur angegebenen Modifikation oder starke Kreuzreaktivitäten.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Spezifitätsanalyse für alle Antikörper, die in den RPPA-Analysen eine Veränderung zeigten, dargestellt. Tabelle 18 listet die zur Klassifizierung verwendeten Werte, die entsprechend 3.4.5 berechnet wurden. Außerdem ist die Klassifizierung der Antikörper gelistet. In Tabelle 19 sind für dieselben Antikörper alle Peptide dargestellt, die Signalwerte über dem berechneten Schwellenwert zeigten. Fett markiert sind Peptide mit relevanten Modifikationen, bei den anderen Signalen handelt es sich um Kreuzreaktivitäten.

Tabelle 18 Klassifizierung der mittels Peptidarrays analysierten Anti-Histon-Antikörper

Aus den Signalstärken (MFI) des Peptidarrays wurden Sensitivität und Spezifität der Antikörper berechnet. Die Klassifizierung erfolgte abhängig vom PPV: hochspezifisch I bei $PPV = 1,0$, gute Spezifität II bei $PPV > 0,6$, unspezifisch III bei $PPV < 0,6$.

Abkürzungen: PPV – positiver Vorhersagewert, p – phospho, ac – acetyl, me1 – monomethyl, me3 – trimethyl, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten, na – nicht anwendbar

	H2B K5ac [1]	H2B K5ac [2]	H2B K5ac [3]	H3 K4me1	H3 K9ac [1]	H3 K9ac [2]	H3 K9acS10p	H3 K9acK14ac
Mittelwert μ	5,97	5,93	5,95	4,47	4,96	6,93	3,87	8,15
Standardabweichung σ	0,88	0,41	0,67	0,23	0,94	0,61	0,57	0,79
Schwellenwert (99,9%)	5836	1334	3037	179	2640	6782	278	40203
Peptide über dem Schwellenwert	9	7	9	18	12	33	37	26
Peptide mit relevanter Modifikation	8	8	8	37	40	40	59	54
Echt Positive	5	5	5	16	6	33	36	26
Falsch Positive	4	2	4	2	6	0	1	0
Echt Negative	372	374	372	345	338	344	324	330
Falsch Negative	3	3	3	21	34	7	23	28
Spezifität	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	1,00	1,00	1,00
Sensitivität	0,63	0,63	0,63	0,43	0,15	0,83	0,61	0,48
Positiver Vorhersagewert PPV	0,56	0,71	0,56	0,89	0,50	1,00	0,97	1,00
Klassifizierung	III	II	III	II	III	I	II	I
Erweiterte Reaktivität mit		H3 K4ac			H4 K20ac			
	H3 S10p	H3 T11p [1]	H3 T11p [2]	H3 K27me3 [1]	H3 K27me3 [2]	H3 S28p [1]	H3 S28p [2]	H3 S28p [3]
Mittelwert μ	3,62	4,71	6,94	5,70	7,36	6,93	6,91	3,57
Standardabweichung σ	0,44	0,49	0,37	2,40	1,07	0,34	0,95	0,70
Schwellenwert (99,9%)	148	509	3226	502867	43436	2946	18927	314
Peptide über dem Schwellenwert	21	15	29	0	1	0	1	4
Peptide mit relevanter Modifikation	23	23	23	7	7	16	16	16
Echt Positive	17	15	22	0	1	0	0	3
Falsch Positive	4	0	7	0	0	0	1	1
Echt Negative	357	361	354	377	377	368	367	367
Falsch Negative	6	8	1	7	6	16	16	13
Spezifität	0,99	1,00	0,98	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Sensitivität	0,74	0,65	0,96	0,00	0,14	0,00	0,00	0,19
Positiver Vorhersagewert PPV	0,81	1,00	0,76	na	1,00	na	0,00	0,75
Klassifizierung	II	I	II	na	na	na	na	II
Erweiterte Reaktivität mit	H3 R2me2s		H4 K20me1					H3

Tabelle 19 Kreuzreaktivitäten relevanter Anti-Histon-Antikörper nach Analyse mittels Peptidarrays

Für die in dieser Arbeit relevanten Antikörper sind die Signale (MFI) aller Peptide aufgetragen, die über dem Schwellenwert liegen. Fett sind die Signale der Peptide, welche die relevante Modifikation enthalten. Bei allen anderen Signalen handelt es sich um Kreuzreaktivitäten zu anderen Modifikationen. Für zwei Antikörper sind grau hinterlegt Signale dargestellt, die unter dem Schwellenwert liegen.

Abkürzungen: p – phospho, ac – acetyl, me1 – monomethyl, me3 – trimethyl, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten

Histon H3 T11p [1]	MFI [AU]	Histon H3 T11p [2]	MFI [AU]	Histon H2B K5ac [1]	MFI [AU]
H3 T11p	30192	H3 T11p	42191	H3 R26me2s_K27ac	42193
H3 R8me2a_K9me3_T11p	17633	H3 R8me2a_K9me3_T11p	39704	H2B K5ac_K12ac_K15ac	40983
H3 R8me2s_K9me1_T11p	9030	H3 R8me2s_K9me1_T11p	26865	H2B K5ac	39047
H3 T11p_K14ac	7178	H3 R8me2s_K9me3_T11p	26116	H3 R26me2a_K27ac	35866
H3 K9me1_T11p	6020	H3 R8me2a_K9me3_S10p_T11p	24170	H2B K5ac_K12ac	31763
H3 R8citr_T11p	4530	H3 R8me2a_K9me1_S10p_T11p	22823	H2B K5ac_K15ac	28467
H3 R8me2a_T11p	2956	H3 K9me1_T11p	22259	H3 K27ac	25332
H3 R8me2s_T11p	2518,5	H3 R8me2s_K9ac_T11p	19483	H3 K4ac_R8me2s_K9ac	23534
H3 R8me2a_K9me1_T11p	2322	H3 T11p_K14ac	16388	H2B K5ac_K12ac_S14p	13921
H3 K9me3_T11p	1053	H3 R8me2a_K9ac_S10p_T11p	13554		
H3 R8me2a_K9me3_S10p_T11p	864	H3 K9me3_T11p	13723	Histon H2B K5ac [2]	MFI [AU]
H3 R8me2s_K9me3_T11p	723	H3 R8citr_T11p	12600	H2B K5ac	30261
H3 K9me2_T11p	717	H3 R8me2a_K9me2_T11p	12445	H2B K5ac_K12ac_K15ac	28143
H3 K14ac_T11p	673,5	H3 R8me2a_K9me1_T11p	11780	H2B K5ac_K12ac	23191
H3 R8me2a_K9me1_S10p_T11p	619	H3 R8me2s_K9me2_T11p	11062	H2B K5ac_K15ac	20347
		H3 S10p_T11p	10583	H3 K4ac_R8me2s_K9ac	4836
Histon H3 K4me1	MFI [AU]	H4 R19me2s_K20me1	10305	H2B K5ac_K12ac_S14p	4806
H3 K4me1_R8me2s_K9me3	32749	H3 K9ac_T11p	9584	H3 K4ac_R8me2a_K9me3	1609
H3 K4me1_R8me2a_K9me3	31666	H4 K16ac_K20me1	9448		
H3 K4me1_R8me2a_K9me2	26991	H3 R8me2a_K9ac_T11p	9302	Histon H2B K5ac [3]	MFI [AU]
H3 K4me1_R8me2s_K9me2	22086	H4 R24me2s_K20me1	8874	H2B K5ac_K12ac_K15ac	24573
H3 K4me1_R8me2a_K9ac	16338	H3 K9me2_T11p	8215	H2B K5ac	22109
H3 K4me1_R8me2a_K9me1	13361	H3 R8me2a_K9me2_S10p_T11p	8079	H2B K5ac_K12ac	17195
H3 K4me1	9536	H3 R8me2a_T11p	7823	H2B K5ac_K15ac	16483
H3 K4me1_R8me2s_K9ac	8797	H4 K12ac_K16ac_K20me1	7748	H3 K4ac_R8me2s_K9ac	7515
H3 K4me1_R8me2s_K9me1	6938	H3 R8me2s_T11p	7085	H2B K5ac_K12ac_S14p	6502
H3 R2me2a_K4me1_R8me2a_K9r	489	H4 R19me2a_K20me1	6627	H3 R26me2s_K27ac	3644
H3 R2me2s_K4me1_R8me2a_K9r	345	H4 R24me2a_K20me1	6328	H4 K8ac_K12ac_K16ac	3630
H3 R2me2s_K4me1_R8me2s_K9r	259	H4 K20me1	5908	H3 R26me2a_K27ac	3570
H3 R2me2s_K4me1_R8me2a_K9r	218				
H3 R8me2s_K9me3	201	Histon H3 K27me3 [1]	MFI [AU]	Histon H3 K27me3 [2]	MFI [AU]
H3 R2me2a_K4me1_R8me2s_K9r	189	H3 R26me2a_K27me3	54754	H3 R26me2a_K27me3	48497
H3 R2me2a_K4me1_R8me2a_K9r	189	H3 K27me3	42940	H3 K27me3	40268
H3 R2me2s_K4me1_R8me2s_K9a	181	H3 R26citr_K27me3	33313	H3 R26me2s_K27me3	25793
H3 R2me2a_K4me3_R8me2s_K9r	179	H3 R26me2s_K27me3	31874	H3 R26citr_K27me3	24238

Histon H3 K9ac [1]	MFI [AU]	Histon H3 K9ac [2]	MFI [AU]	Histon H3 K9acS10p	MFI [AU]	Histon H3 K9ack14ac	MFI [AU]
H4 K12ac_K16ac_K20ac	6595	H3 K4ac_R8me2s_K9ac	33481	H3 K4ac_R8me2s_K9ac	1677	H3 R2me2s_K4me1_R8me2a_K9ac	52254
H3 K9ac_K14ac	5749	H3 R2me2s_K4me1_R8me2s_K9ac	31947	H3 K9ac_S10p	1220	H3 R2me2s_K4me1_R8me2s_K9ac	51932
H4 K20ac	5603	H3 R2me2a_K4me3_K9ac	29510	H3 R2me2a_K4me3_K9ac	929	H3 R2me2s_K4me3_R8me2s_K9ac	51045
H3 K9ac	5340	H3 R8citr_K9ac	29550	H3 R8me2a_K9ac	856	H3 K4ac_R8me2s_K9ac	50837
H3 R2me2a_K4me3_K9ac	5278	H3 K9ac_K14ac	29135	H3 R2me2s_K4me1_R8me2a_K9ac	819	H3 R2me2a_K4me3_K9ac	50364
H3 R2me2a_K4ac_K9ac	5166	H3 R2me2a_K4me2_K9ac	28766	H3 R8me2s_K9ac	804	H3 K4me3_R8me2a_K9ac	48002
H3 R2me2a_K4me1_K9ac	4495	H3 R2me2s_K4me3_R8me2s_K9ac	28651	H3 K9ac	791	H3 R2me2a_K4me1_R8me2s_K9ac	47967
H4 K16ac_K20ac	4412	H3 R2me2s_K4me1_R8me2a_K9ac	28628	H3 R2me2a_K4me1_K9ac	779	H3 R2me2a_K4me2_K9ac	47644
H3 R2me2a_K4me2_K9ac	4168	H3 R2me2a_K4ac_K9ac	27867	H3 K4me3_R8me2s_K9ac	746	H3 R2me2a_K4ac_K9ac	46723
H4 R24me2s_K20ac	3803	H3 R2me2a_K4ac_K9ac	27729	H3 K4me3_R8me2s_K9ac	738	H3 R2me2a_K4me3_R8me2s_K9ac	46377
H4 R24me2a_K20ac	3770	H3 R8me2a_K9ac	26658	H3 R2me2a_K4ac_K9ac	700	H3 R2me2s_K4me2_R8me2s_K9ac	46331
H3 K14ac_K18ac	2719	H3 R2me2s_K4me2_R8me2s_K9ac	26461	H3 R8citr_K9ac	677	H3 K9ac_K14ac	46192
		H3 K9ac	25713	H3 R2me2s_K4me1_R8me2s_K9ac	673	H3 K9ac	45559
Histon H3 S10p	MFI [AU]	H3 R2me2a_K4me3_R8me2s_K9ac	25148	H3 R2me2s_K4me3_R8me2s_K9ac	662	H3 R8me2a_K9ac	45155
H3 R8me2a_K9me1_S10p	1156	H3 R8me2s_K9ac	24272	H3 R2me2s_K4me2_R8me2s_K9ac	627	H3 K4me3_R8me2s_K9ac	44855
H3 R8me2a_K9ac_S10p	1044	H3 R2me2a_K4ac_R8me2a_K9ac	23811	H3 R2me2a_K4me3_R8me2a_K9ac	621	H3 R8citr_K9ac	43104
H3 R8me2s_K9ac_S10p	1031	H3 R2me2a_K4me1_K9ac	23327	H3 R8me2a_K9ac_S10p	614	H3 K4ac_R8me2a_K9ac	43035
H3 K9ac_S10p	966	H3 K4me3_R8me2a_K9ac	23327	H3 R2me2a_K4me2_K9ac	611	H3 R2me2a_K4ac_R8me2a_K9ac	42896
H3 R8me2s_S10p	959	H3 K4me3_R8me2s_K9ac	23211	H3 R2me2a_K4ac_R8me2a_K9ac	602	H3 K4me1_R8me2a_K9ac	42827
H3 R8me2s_K9me2_S10p	931	H3 R2me2a_K4ac_R8me2s_K9ac	22451	H3 K4me1_R8me2a_K9ac	592	H3 R2me2a_K4me1_R8me2a_K9ac	42527
H3 R8me2s_K9me3_S10p	791	H3 R2me2s_K4ac_R8me2s_K9ac	22082	H3 R2me2s_K4me3_R8me2a_K9ac	586	H3 R2me2a_K4me1_K9ac	42193
H3 S10p	608	H3 K4ac_R8me2a_K9ac	21598	H3 K4me2_R8me2a_K9ac	582	H3 R2me2a_K4me2_R8me2a_K9ac	41260
H3 S10p_K14ac	476	H3 R2me2a_K4me2_R8me2a_K9ac	21414	H3 K4me1_R8me2s_K9ac	575	H3 R8me2s_K9ac	41213
H3 K9me2_S10p	476	H3 K4me1_R8me2a_K9ac	20722	H3 K9ac_K14ac	571	H3 K4me2_R8me2a_K9ac	40430
H3 R8me2a_K9me2_S10p	434	H3 R2me2a_K4me1_R8me2a_K9ac	20273	H3 K4ac_R8me2a_K9ac	560	H3 R2me2a_K4ac_R8me2s_K9ac	40430
H3 R8citr_S10p	355	H3 K4me2_R8me2a_K9ac	19062	H3 K4me2_R8me2s_K9ac	545	H3 R2me2s_K4ac_R8me2s_K9ac	40246
H3 K9me1_S10p	329	H3 K4me2_R8me2s_K9ac	18636	H3 R2me2a_K4me2_R8me2a_K9ac	540	Histon H3 S28p [2]	MFI [AU]
H3 R8me2a_S10p	315	H3 R2me2a_K4me2_R8me2s_K9ac	18210	H3 R2me2s_K4ac_R8me2a_K9ac	538	H3 K14ac_R17me2s_K18ac	20440
H3 R8me2s_K9me1_S10p	305	H3 R2me2s_K4me2_R8me2a_K9ac	17795	H3 R2me2a_K4me1_R8me2s_K9ac	496	Histon H3 S28p [3]	MFI [AU]
H3 R8me2a_K9me3_S10p	261	H3 K4me1_R8me2s_K9ac	17518	H3 R2me2s_K4me2_R8me2a_K9ac	490	H3 R26me2s_K27me2_S28p	596
H3 R2me2s_K4ac	215	H3 R2me2s_K4me3_R8me2a_K9ac	17167	H3 R2me2a_K4ac_R8me2s_K9ac	479	H3 unmod	583
H3 K9me3_S10p	213	H3 R2me2a_K4me3_R8me2a_K9ac	16956	H3 R2me2a_K4me1_R8me2a_K9ac	478	H3 K27me2_S28p	546
H3 R2me2s	165	H3 R2me2s_K4ac_R8me2a_K9ac	16196	H3 R8me2s_K9ac_S10p	475	H3 K27ac_S28p	352
H3 K4me1	156			H3 R2me2a_K4me2_R8me2s_K9ac	468		
H3 R2me2s_K4me2	156			H3 R2me2a_K4me3_R8me2s_K9ac	463		
				H3 R2me2s_K4ac_R8me2s_K9ac	459		
				H3 K27ac_S28p	283		

Der Anti-Histon H3 K9acK14ac-Antikörper soll laut Hersteller nur Histone erkennen, die gleichzeitig an Lysin 9 und Lysin 14 acetyliert vorliegen. Diese Charakteristik konnte im Peptidarray nicht bestätigt werden. Dort wurde deutlich, dass der Antikörper die alleinige Acetylierung an Lysin 9 erkennt, nicht jedoch die an Lysin 14. Diese verstärkt zwar die Bindung, ist aber nicht essentiell. Des Weiteren wurde die Affinität zu den Peptiden stark herabgesetzt, wenn Serin 10 oder Threonin 11 phosphoryliert waren. Der Antikörper wurde als hochspezifisch klassifiziert (PPV 1,0), mit der Einschränkung, dass die Acetylierung von Lysin 14 keinen Einfluss auf die Affinität des Antikörpers hat.

Gegen acetyliertes Histon H2B (K5) wurden drei Antikörper getestet. Zwei der Antikörper wurden mit einem PPV von 0,56 als unspezifisch klassifiziert ([1] und [3]). Anti-Histon H2B K5ac [1] zeigte außerdem Nebenreaktivität zu Histon H3 K27ac. Anti-Histon H2B K5ac [2] wurde als spezifisch klassifiziert (PPV 0,71), mit leichter Nebenreaktivität zu Histon 3 K4ac. Alle drei Antikörper banden Peptide mit Phosphorylierung an Serin 14 weniger gut.

Es wurden zwei Antikörper gegen Histon H3, phosphoryliert an Threonin 11, getestet. Anti-Histon H3 T11p [1] wurde als hochspezifisch klassifiziert (PPV 1,0), durch Acetylierung von Lysin 9 wurde die Bindung des Antikörpers ans Epitop aber reduziert. Während Mono- und Trimethylierungen an Lysin 9 die Bindung nicht störten, setzte eine Dimethylierung die Reaktivität ebenfalls herunter. Ebenso wirkte sich eine Phosphorylierung an Serin 10 negativ auf das Bindevverhalten aus.

Anti-Histon H3 T11p [2] zeigte zusätzliche Bindung zu Histon H4 K20me1 und wurde als spezifisch klassifiziert (PPV 0,76). Es wurde keine Beeinflussung der Bindeeigenschaften des Antikörpers aufgrund benachbarter Modifikationen festgestellt.

Für Histon H3 S28p wurden drei Antikörper getestet. Zwei der Antikörper zeigten keinerlei Reaktivität zu phosphoryliertem Serin 28 ([1] und [2]). Einerseits wurden weniger als drei Peptide mit einem Wert über dem Schwellenwert detektiert, andererseits waren die Peptide mit den höchsten Signalen nicht an Serin 28 phosphoryliert. Diese beiden Antikörper konnten die Spezifitätskriterien somit nicht erfüllen. Anti-Histon H3 S28p [3] zeigte Substratspezifität (PPV 0,75), allerdings wurde eine Kreuzreaktivität zu unmodifiziertem Histon H3 detektiert.

Der Antikörper gegen Histon H3 K4me1 wurde als spezifisch klassifiziert (PPV 0,89), wobei die Phosphorylierung von Threonin 3 und Methylierung von Arginin 2 die Affinität des Antikörpers zu seinem Epitop reduzierte.

Gegen Histon H3 K27me3 wurden zwei Antikörper getestet. Beide Antikörper banden bevorzugt an relevante Peptide, erreichten aber mit weniger als drei Peptiden einen Wert über dem Schwellenwert, weshalb sie nicht klassifiziert werden konnten. Außerdem wurde eine Insensitivität gegenüber Peptiden mit phosphoryliertem Serin 28 nachgewiesen.

Besonders intensiv wurden Antikörper gegen acetyliertes Histon H3 (K9) getestet. An diesem Beispiel soll dargestellt werden, welcher Nutzen aus dem Peptidarray gezogen werden kann.

Einer der Antikörper (Anti-Histon H3 K9ac [2]) war hochspezifisch (PPV 1,0), der andere (Anti-Histon H3 K9ac [1]) zeigte eine deutliche Kreuzreaktivität zu Histon H4 K20ac und wurde als unspezifisch klassifiziert (PPV 0,5). Um Unterschiede in der Sensitivität der beiden Antikörper deutlich zu machen, wurden von Hannes Planatscher Bindematrizen erstellt (Abbildung 24). Diese *Bubble Blots* repräsentieren all diejenigen Peptide des Arrays, die eine oder zwei Modifikationen in der Nähe des Antikörperepitops (Aminosäuren 1-19 von Histon H3) besitzen. Je stärker Peptide mit der entsprechenden Modifikation gebunden wurden, desto dunkler und größer sind die dargestellten Blasen. Beide Antikörper zeigten eine starke Affinität zu den an Lysin 9 acetylierten Peptiden. Die Bindung von Anti-Histon H3 K9ac [1] an sein Epitop wurde durch Modifikationen an Arginin 8 stark beeinträchtigt, unbeeindruckt hiervon blieb Anti-Histon H3 K9ac [2]. Die Phosphorylierung an Serin 10 beeinflusste hingegen beide Antikörper und verhinderte die Epitopbindung. Somit ist Anti-Histon H3 K9ac [1] zusätzlich zur Kreuzreaktivität mit Histon H4 K20ac auch insensitiv gegenüber Peptiden mit modifiziertem Arginin 8.

Auch für einen Antikörper, der laut Hersteller die Doppelmodifikation von Histon H3 (K9acS10p) erkennen sollte, wurde ein Bindeprofil erstellt (Abbildung 24). Dieser Antikörper band Peptide, die gleichzeitig an Lysin 9 und Serin 10 modifiziert vorlagen, auch eine Modifikation an Arginin 8 veränderte die Bindeeigenschaften nicht. Allerdings wurden nicht nur doppelt modifizierte Peptide erkannt, sondern unabhängig vom Phosphorylierungszustand von Serin 10 auch einzeln an Lysin 9 acetylierte Peptide. Die Antikörperbindung wurde durch Phosphorylierung von Serin 10 zwar verstärkt, stellte aber keine Bedingung für die Antikörperbindung dar und wurde nur in Kombination mit acetyliertem Lysin 9 gebunden.

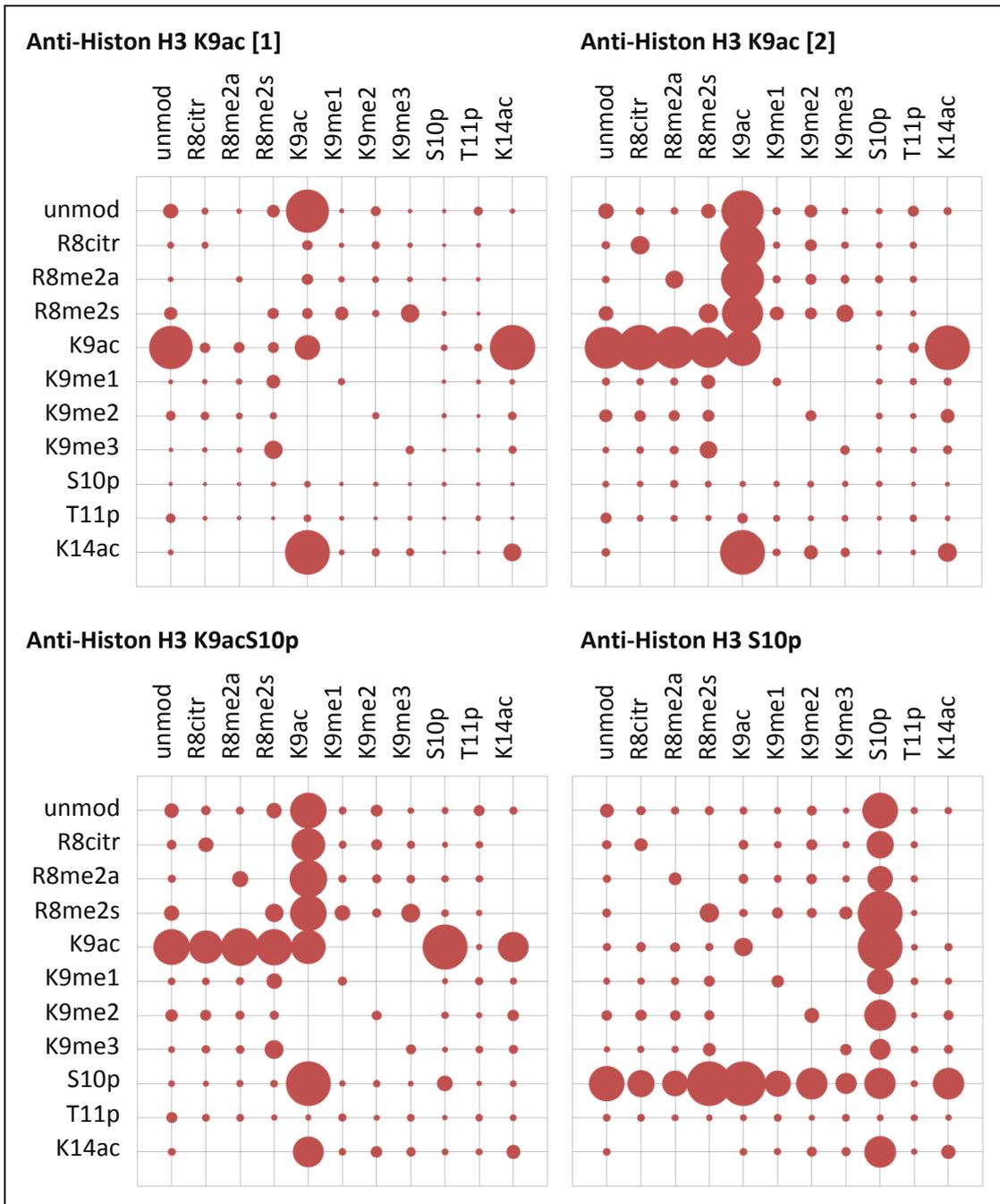


Abbildung 24: Beeinflussung der Antikörperbindung durch benachbarte Modifikationen im Epitop

Die Bindung der Antikörper an Peptide, welche die Region der Aminosäuren 1-19 von Histon H3 repräsentieren, ist in Fluoreszenzintensitäten (MFI, *median fluorescence intensities*) in Form eines *Bubble Blots* dargestellt. Nur einfach oder zweifach modifizierte Peptide wurden für diese Analyse verwendet. Die erste Spalte bzw. Reihe entspricht der Antikörperbindung an einfach modifizierte Peptide, dem restlichen Blot kann die Bindung zu doppelt modifizierten Peptiden entnommen werden. Die Diagonale entspricht dem Mittelwert über alle Peptide mit dieser Modifikation. Der Unterschied zwischen diesem Wert und dem Wert in der ersten Spalte bzw. Reihe gibt an, ob durch diese Modifikation die Antikörperbindung positiv oder negativ beeinflusst wird.

Abkürzungen: p – phospho, ac – acetyl, me1 – monomethyl, me2 – dimethyl, me3 – trimethyl, me2a – asymmetrisch dimethyliertes Arginin, me2s – symmetrisch dimethyliertes Arginin, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten

Die *Bubble Blots* waren von Hannes Planatscher für Heubach *et al.* (2013) erstellt worden und wurden freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Der Antikörper gegen Histon H3 S10p wurde als spezifisch kategorisiert (PPV 0,81). Nebenreaktionen wurden zu Histon H3 R2me2 und Histon H3 K4me1 detektiert, welche aber deutlich schwächer gebunden wurden als die Phosphorylierung an Serin 10. Nur durch Phosphorylierung von Threonin 11 wurde die Bindung des Antikörpers an sein Epitop verhindert, andere Modifikationen in der näheren Umgebung beeinflussten die Antikörperbindung nicht (Abbildung 24).

Um die Bedeutung dieses Peptidarrays aufzuzeigen, wurden HeLa-Zellen für 24 h mit 0,05 µg/ml Colcemid oder 0,1 µg/µl Paclitaxel behandelt, lysiert und die Zellextrakte mittels Western Blot untersucht (Abbildung 25). Die antimitotischen Substanzen Colcemid und Paclitaxel beeinträchtigen die Mikrotubuliorganisation und es kommt zum Zellzyklusarrest in der Metaphase, was eine erhöhte Phosphorylierung von Histon H3 an Serin 10 zur Folge hat. Dies konnte durch den Western Blot bestätigt werden. Die im Western Blot detektierten Signale der beiden Anti-Histon H3 K9ac-Antikörper wurden durch die Behandlung mit Colcemid oder Paclitaxel drastisch reduziert. Das Signal von Anti-Histon H3 K9acS10p nahm hingegen deutlich zu.

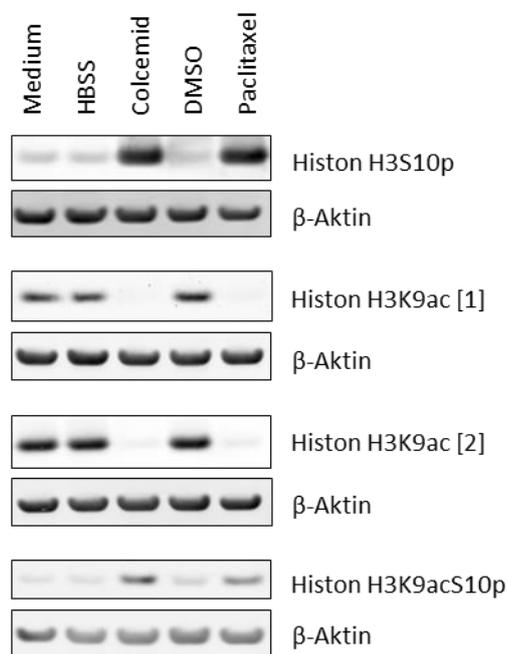


Abbildung 25: Acetylierung (K9) und Phosphorylierung (S10) von Histon H3 nach Behandlung von HeLa-Zellen mit Colcemid oder Paclitaxel

HeLa-Zellen wurden für 24 h mit 0,05 µg/ml Colcemid in HBSS bzw. 0,1 µg/ml Paclitaxel in DMSO behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (Medium) sowie Behandlungen mit 0,01 % HBSS bzw. DMSO. Je 15 µg Protein der nativen Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und nach Antikörperinkubation mittels Fluoreszenz bei 800 nm detektiert. β-Aktin wurde zur Ladekontrolle bei 680 nm detektiert. Abkürzungen: p – phospho, ac – acetyl, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten.

4.3.3.2 Einfluss von C1 und C2 auf Histonmodifikationen in NCCIT-Sphäroiden

Der Einfluss der Histon-Deacetylase-Inhibitoren C1 und C2 auf Histonmodifikationen wurde in NCCIT-Sphäroiden analysiert. Die Zeitverlaufdiagramme differenziell modifizierter Histone sind in Abbildung 26 dargestellt.

Alle Anti-Histon-Antikörper waren mittels Peptidarrays im Detail charakterisiert worden. Waren RPPA-Ergebnisse mehrerer Antikörper gegen dasselbe Epitop verfügbar, so wurden für die Interpretation der Ergebnisse jeweils nur die laut Peptidarray spezifischen Antikörper berücksichtigt.

Die Behandlung der NCCIT-Sphäroide mit dem HDACi C1 hatte einen starken Anstieg der Acetylierung an Lysin 9 zur Folge. Mit C2 konnte kein Effekt auf die Acetylierung der Histone beobachtet werden. C1 bewirkte außerdem, beginnend ab 0,5 h, eine verstärkte Monomethylierung von Histon H3 an Lysin 4.

Starke Effekte zeigten beide HDACi auf die Histonphosphorylierung. Bedingt durch C1 stieg die Phosphorylierung von Threonin 11 bis zu einem Maximum bei 6 h an, mit anschließendem Abfall. Ähnlich, aber in stärkerem Maße, wurde diese Phosphorylierung durch C2 beeinflusst. Außerdem stieg die Phosphorylierung an Serin 10 durch C2 nach 2-stündiger Behandlung an und fiel ab 24 h wieder leicht ab.

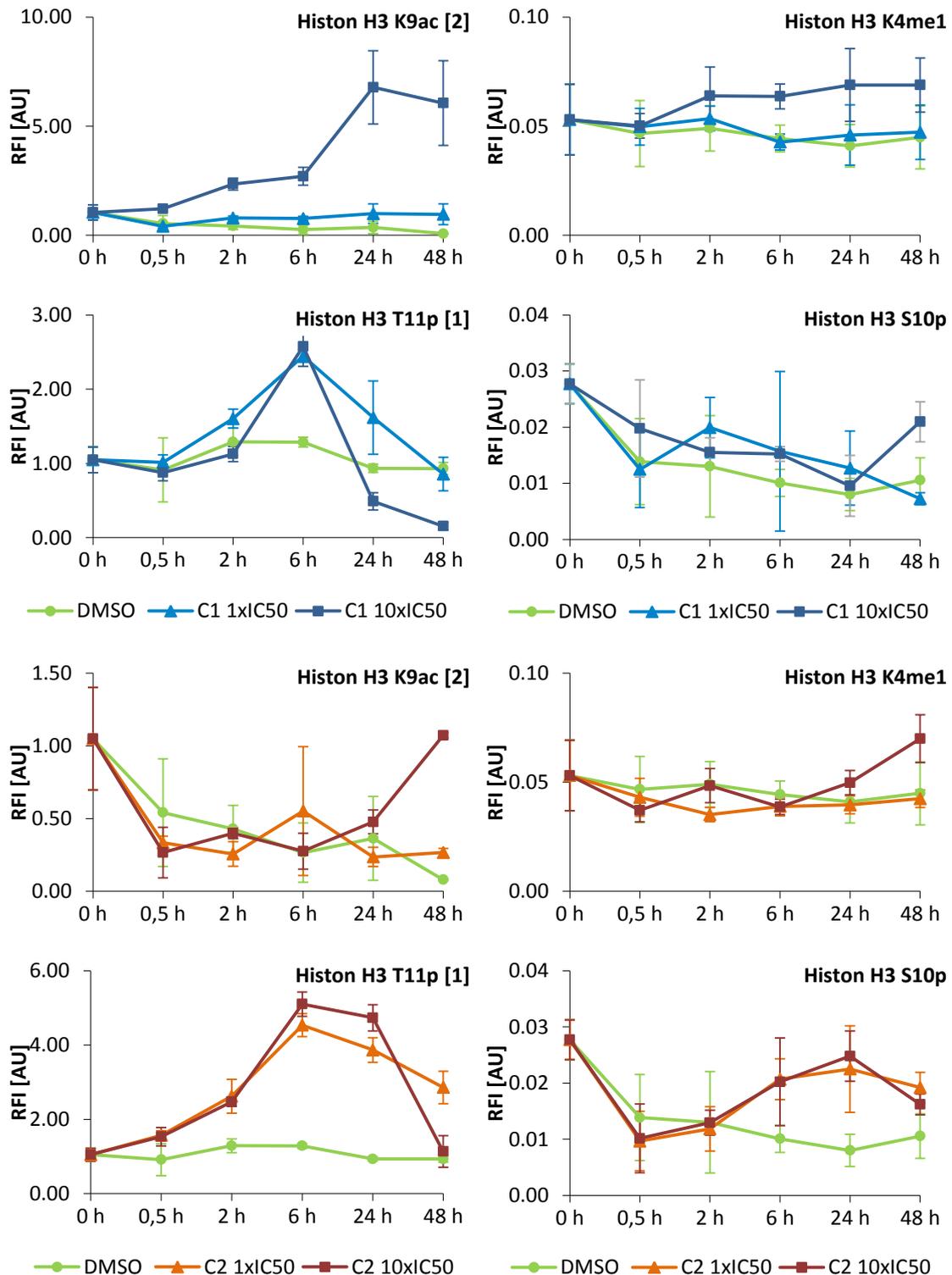


Abbildung 26: Zeitverläufe der Modifikation von Histonen nach Behandlung von NCCIT-Sphäroiden mit C1 und C2

NCCIT-Sphäroide wurden in drei Replikaten mit den angegebenen Konzentrationen (1xIC₅₀, 10xIC₅₀) der Substanzen C1 oder C2 behandelt. Als Lösungsmittelkontrolle diente 0,1 % DMSO (je 2-4 Replikate). Der Expressions- und Modifikationsstatus von 81 Proteinen wurde mittels RPPA analysiert. Die Signalwerte wurden auf die immobilisierte Proteinmenge normiert. Die Mittelwerte der Replikate einiger differenziell exprimierter bzw. modifizierter Proteine sind mit zugehöriger Standardabweichung aufgetragen.

Abkürzungen: RFI – relative Fluoreszenzintensität, AU – willkürliche Einheiten (*arbitrary units*), p – phospho, ac – acetyl, me1 – monomethyl, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten

4.3.3.3 Einfluss von C1, C2 und C5 auf Histonmodifikationen in HT-29-Sphäroiden

Die Expression und Modifikation von Histonen wurde in HT-29-Sphäroiden nach Behandlung mit den HDACi C1 und C2 sowie dem Eg5-Inhibitor C5 analysiert.

Durch Behandlung der Sphäroide mit den HDACi C1 und C2 waren starke Effekte auf die Histonacetylierung erwartet. Dies spiegelte sich besonders im erhöhten Signal des Anti-Histon H3 K9acK14ac-Antikörpers wider. Da dieser im Peptidarray keinerlei Reaktivität mit Lysin 14 gezeigt hatte, liegt dem Signal wahrscheinlich nur die Acetylierung von Lysin 9 zugrunde. Auch der Anti-Histon H3 K9ac [1]-Antikörper zeigte durch C1 in $100\times IC_{50}$ ein erhöhtes RPPA-Signal. Durch die Charakterisierung des Antikörpers ist eine Kreuzreaktivität zu Histon H4 K20ac bekannt. Möglicherweise trägt somit auch eine verstärkte Acetylierung von Histon H4 an Lysin 20 zum Signal bei.

Durch C1 in $100\times IC_{50}$ konnte außerdem eine leicht erhöhte Acetylierung von Histon H2B (K5) detektiert werden. Dieser Antikörper zeigte eine Kreuzreaktivität zu acetyliertem Lysin 27, was somit möglicherweise auch verstärkt acetyliert vorlag.

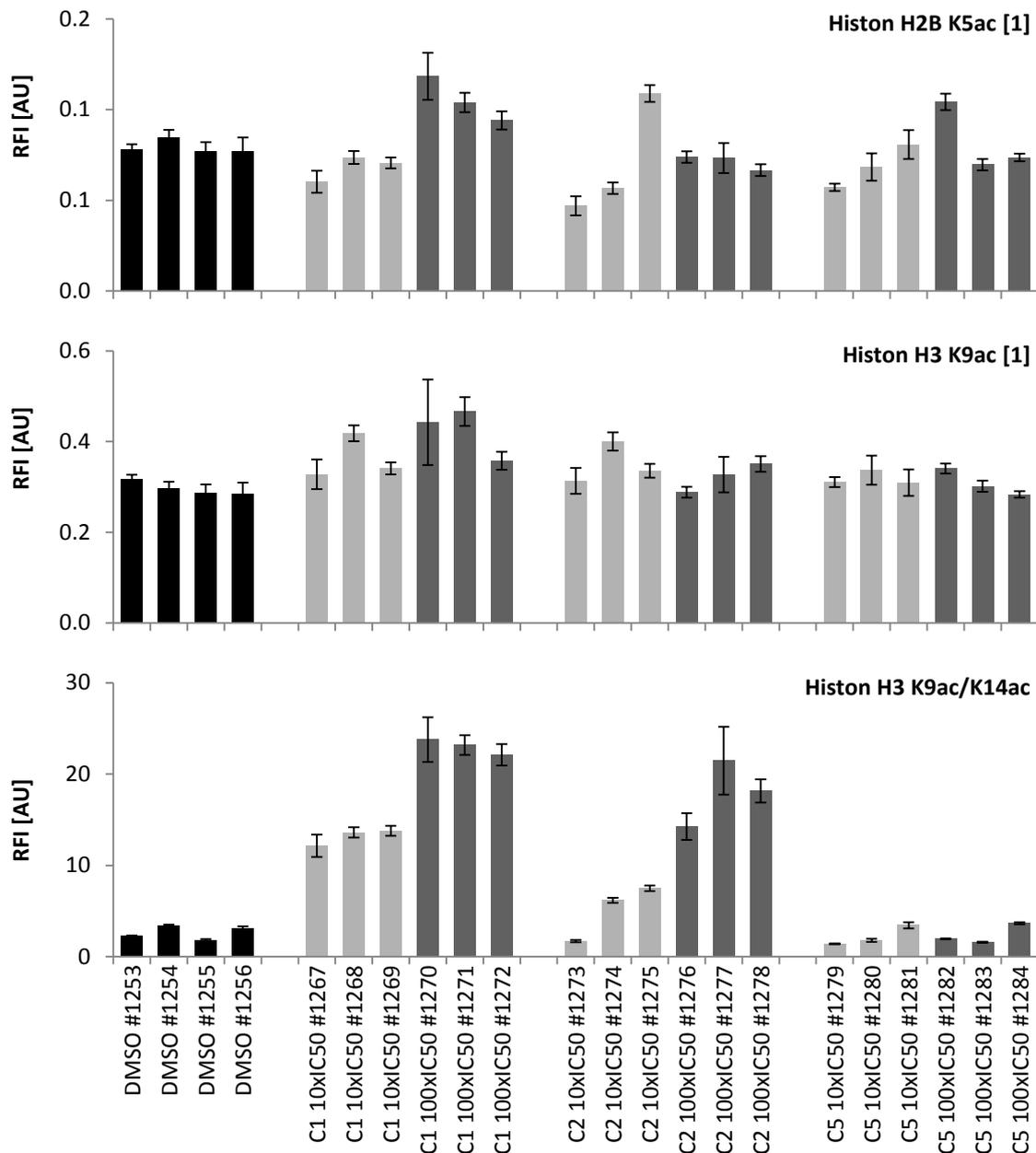


Abbildung 27: Acetylierung der Histone nach Behandlung von HT-29-Sphäroiden mit C1, C2 und C5

HT-29-Sphäroide wurden in drei Replikaten mit den angegebenen Konzentrationen (10xIC₅₀, 100xIC₅₀) der Substanzen C1, C2 oder C5 für 46 h behandelt. Als Lösungsmittelkontrolle diente 0,2 % DMSO in Zellkulturmedium. Der Expressions- und Modifikationsstatus von Proteinen wurde mittels RPPA analysiert. Die Signalwerte wurden auf die immobilisierte Proteinmenge normiert und sind mit zugehöriger Standardabweichung aufgetragen. Dargestellt ist die veränderte Acetylierung der Histone H2B und H3 nach Behandlung mit den Substanzen.

Abkürzungen: RFI – relative Fluoreszenzintensität, AU – willkürliche Einheiten (*arbitrary units*), ac – acetyl, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten

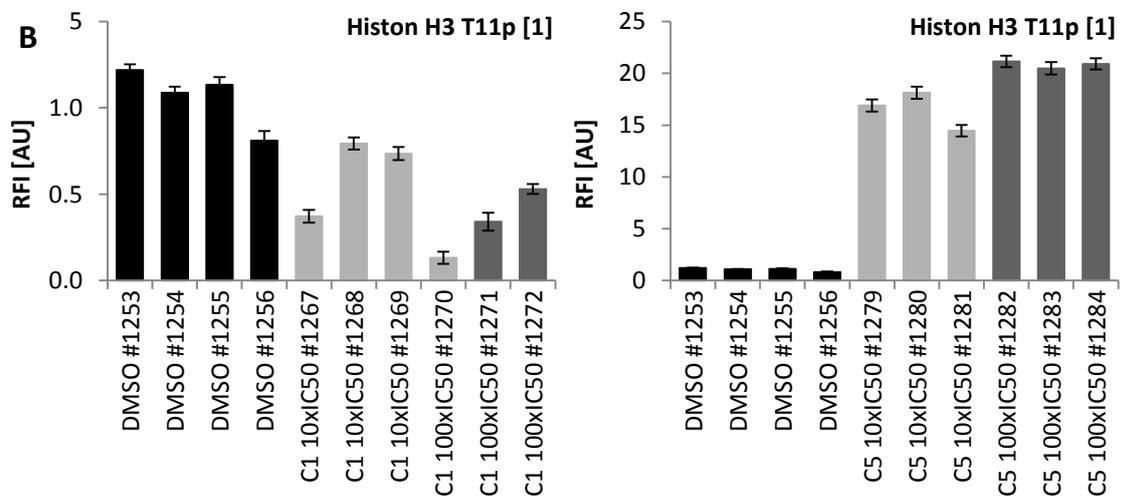
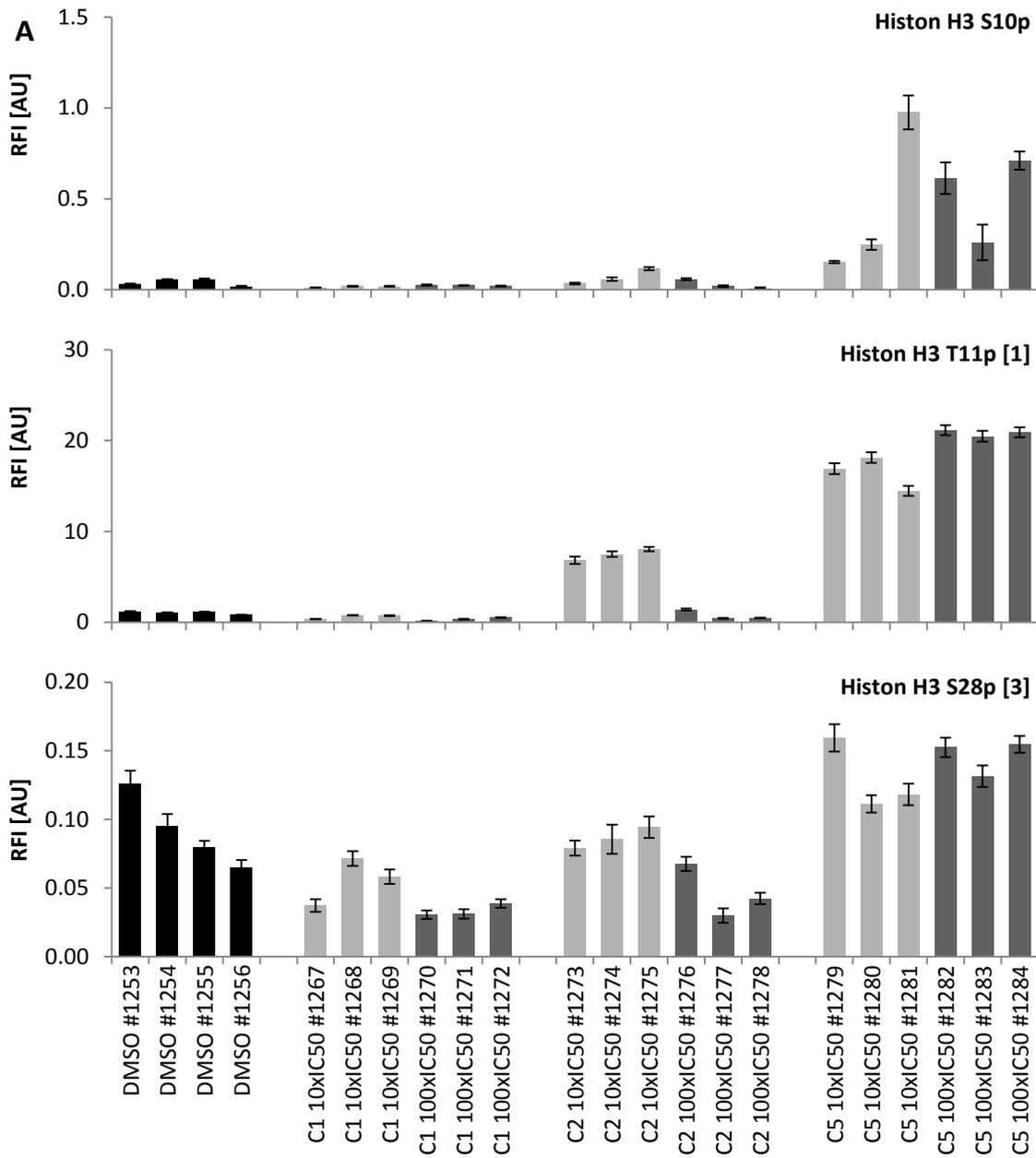


Abbildung 28: Phosphorylierung der Histone nach Behandlung von HT-29-Sphäroiden mit C1, C2 und C5

HT-29-Sphäroide wurden in drei Replikaten mit den angegebenen Konzentrationen ($10 \times IC_{50}$, $100 \times IC_{50}$) der Substanzen C1, C2 oder C5 für 46 h behandelt. Als Lösungsmittelkontrolle diente 0,2 % DMSO in Zellkulturmedium. Der Expressions- und Modifikationsstatus von Proteinen wurde mittels RPPA analysiert. Die Signalwerte wurden auf die immobilisierte Proteinmenge normiert und sind mit zugehöriger Standardabweichung aufgetragen. A) zeigt die Phosphorylierung von Histon H3 nach Behandlung mit den Substanzen. B) zeigt die Änderungen in der Phosphorylierung von Histon H3 (T11) nach Behandlung mit C1 (links) und C5 (rechts).

Abkürzungen: RFI – relative Fluoreszenzintensität, AU – willkürliche Einheiten (arbitrary units), ac – acetyl, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten

Die Phosphorylierung von Histon H3 an Serin 10, Threonin 11 und Serin 28 wurde durch Behandlung mit C1 in $100 \times IC_{50}$ reduziert. C5 hingegen bewirkte eine deutlich verstärkte Phosphorylierung von Histon H3. Auch C2 in geringer Dosierung hatte eine erhöhte Phosphorylierung an Threonin 11 zur Folge. Die Faktoren dieser Effekte waren stark unterschiedlich. Während C5 zu einer 20-fachen Erhöhung der Phosphorylierung von Threonin 11 führte, wurde die Phosphorylierung durch C1 nur um 1/3 reduziert. Bei Serin 28 war durch C5 eine Erhöhung um den Faktor 1,6, bei C1 eine 0,4-fache Erniedrigung zu sehen.

4.3.4 Verifizierung der RPPA-Analysen mittels Western Blot

Reverse Phase Protein-Mikroarrays eignen sich hervorragend um die Expression und Aktivierung mehrerer dutzend Proteine gleichzeitig auf vielen Proben zu analysieren. Allerdings kann nur durch Verwendung hochspezifischer Antikörper gewährleistet werden, dass dem detektierten RPPA-Signal das richtige Protein zugrunde liegt. Aus diesem Grund wurde die Spezifität aller im RPPA eingesetzten Antikörper mittels Western Blot auf relevanten Zelllinien geprüft. Außerdem wurden retrospektiv ausgewählte RPPA-Ergebnisse mittels Western Blot verifiziert.

Von den im RPPA verwendeten HT-29-Sphäroiden war genügend Material vorhanden, um Western Blot-Analysen durchzuführen (Abbildung 30). NCCIT-Sphäroide wurden neu mit den Substanzen C1 (10 μ M), C2 (4 μ M) und C5 (0,2 μ M) für 6 h und 24 h behandelt. Mit den denaturierend lysierten Sphäroidproben wurden Western Blots durchgeführt (Abbildung 29).

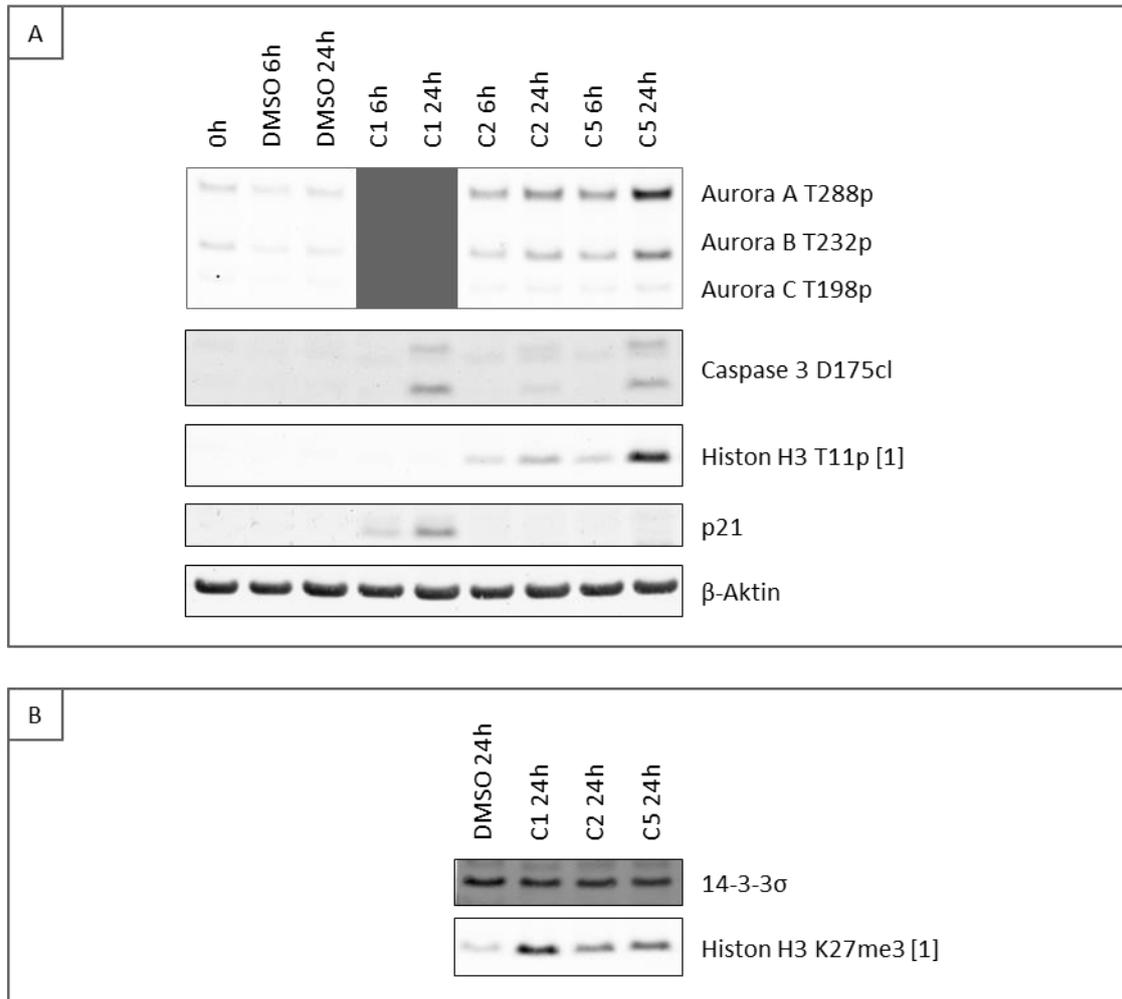


Abbildung 29: Verifizierung der RPPA-Analysen mittels Western Blot

NCCIT-Sphäroide wurden für 6 h und 24 h mit den Substanzen C1 (10 µM), C2 (4 µM) und C5 (0,2 µM) bzw. als Lösungsmittelkontrolle mit 0,1 % DMSO behandelt. Für den Zeitnullpunkt wurden Sphäroide vor Beginn der Behandlung entnommen. Je 10 µg Protein der denaturierend lysierten Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und nach Antikörperinkubation mittels Fluoreszenz bei 680 nm (14-3-3σ, β-Aktin) und 800 nm (Aurora A/B/C T288p/T232p/T198p, Caspase 3 D175cl, Histon H3 T11p [1], Histon H3 K27me3 [1], p21) detektiert.

Folgende Proben wurden verwendet: #3014 0h, #3012 DMSO 6h, #3013 DMSO 24h, #2996 C1 6h, #2997 C1 24h, #3004 C2 6h, #3005 C2 24h, #3008 C5 6h, #3009 C5 24h.

Aurora A/B/C T288p/T232p/T198p wurde auf den folgenden Proben nicht inkubiert: #2996 C1 6h, #2997 C1 24h

Abkürzungen: # - eindeutiger Probenbezeichner, p – phospho, cl – gespalten (*cleaved*), me3 – trimethyl, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten

Durch Behandlung der NCCIT-Sphäroide mit C2 und C5 wurde eine erhöhte Phosphorylierung von Aurora A und Aurora B detektiert, welche durch längere Behandlungszeiten verstärkt wurde. Der Phosphorylierungsgrad von Aurora C blieb hingegen weitgehend unverändert. Der RPPA hatte in NCCIT-Sphäroiden ebenfalls eine erhöhte Aurora-Phosphorylierung durch die Behandlung mit C2 gezeigt.

Auch die Spaltung von Caspase 3 durch Behandlung der NCCIT-Sphäroide mit C1 und C2, welche schon im RPPA detektiert worden war, konnte mittels Western Blot verifiziert

werden. Vor allem durch C1 und nach 24-stündiger Behandlungsdauer stieg die gespaltene Form stark an. Auch durch C5 konnte die Spaltung von Caspase 3 nachgewiesen werden.

Die Phosphorylierung von Histon H3 (T11p) zeigte ein ähnliches Verhalten, wie die Aurorakinasen. C2 und C5 bewirkten mit steigender Behandlungsdauer einen erhöhten Phosphorylierungsgrad, durch C1 wurde die Phosphorylierung nicht beeinflusst. Auch im RPPA war eine erhöhte Phosphorylierung nach Behandlung mit C2 detektiert worden. C1 hatte bei 6 h zu einer leicht erhöhten Phosphorylierung geführt, welche aber schnell wieder abfiel. Dies konnte mittels Western Blot nicht bestätigt werden, da der Effekt aber nur bei 6 h aufgetreten war, wäre es möglich, dass der Anstieg zeitlich verschoben auftritt.

p21 führt zur Inhibition des Zellzyklus am G1/S-Restriktionspunkt. Die Menge an p21 wurde durch Behandlung der NCCIT-Sphäroide mit C1 stark erhöht, vor allem bei längeren Behandlungszeiten.

14-3-3 σ zeigte im Western Blot keine Expressionsänderung. Im RPPA war in NCCIT-Sphäroiden nach Behandlung mit C1 und C2 ab 48 h eine verringerte Expression detektiert worden. Möglicherweise konnte diese Veränderung im Western Blot nicht aufgelöst werden.

Die Trimethylierung von Histon H3 (K27) war nach 24 h durch alle drei Substanzen erhöht, der Effekt von C1 war besonders deutlich. Auch im RPPA war durch C1 eine starke Erhöhung detektiert worden, die bei 48 h noch verstärkt wurde.

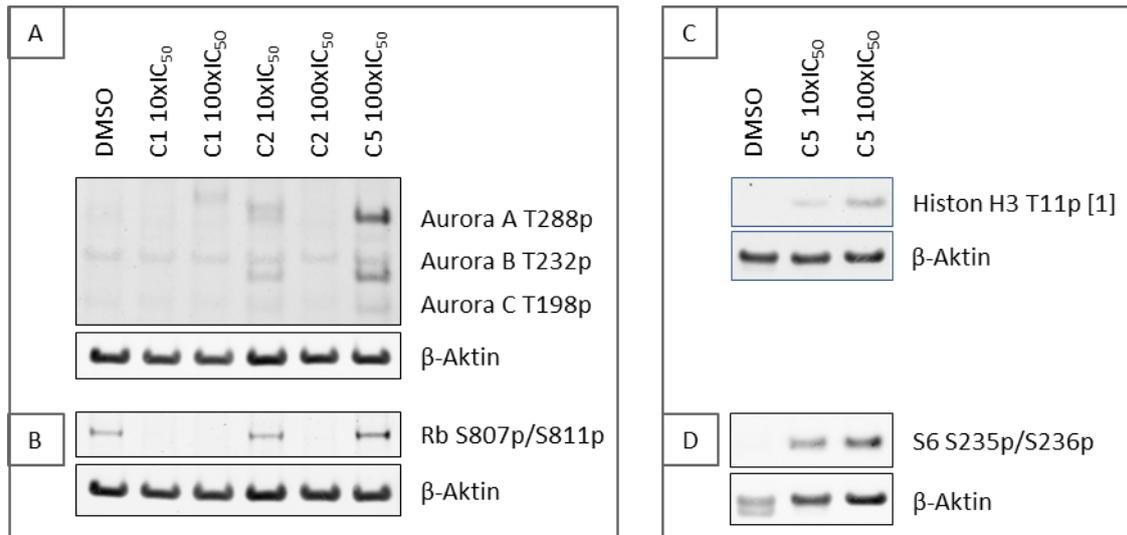


Abbildung 30: Verifizierung der RPPA-Analysen mittels Western Blot

Die HT-29-Sphäroidproben des RPPA-Experiments wurden verwendet. Diese waren für 46 h mit den Substanzen C1 (10 μ M/100 μ M), C2 (4 μ M/40 μ M) und C5 (0,2 μ M/2 μ M) in 10xIC₅₀/100xIC₅₀ bzw. als Lösungsmittelkontrolle mit 0,2 % DMSO behandelt worden. Je 7 μ g (A/B) bzw. 5 μ g (C/D) Protein der denaturierend lysierten Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und nach Antikörperinkubation mittels Fluoreszenz bei 680 nm (β -Aktin) und 800 nm (Aurora A/B/C 288p/T232p/T198p, Rb S807p/S811p, Histone H3 T11p [1], S6 S235p/S236p) detektiert.

Folgende Proben wurden verwendet: A) #1256 DMSO, #1268 C1 10xIC₅₀, #1270 C1 100xIC₅₀, #1273 C2 10xIC₅₀, #1277 C2 100xIC₅₀, #1283 C5 100xIC₅₀ B) #1256 DMSO, #1269 C1 10xIC₅₀, #1271 C1 100xIC₅₀, #1274 C2 10xIC₅₀, #1278 C2 100xIC₅₀, #1284 C5 100xIC₅₀ C) #1253 DMSO, #1280 C5 10xIC₅₀, #1284 C5 100xIC₅₀, D) #1253 DMSO, #1279 C5 10xIC₅₀, #1283 C5 100xIC₅₀

Abkürzungen: # - eindeutiger Probenbezeichner, p – phospho

In den HT-29-Sphäroiden wurde nach Behandlung mit C2 in 10xIC₅₀ und C5 in 100xIC₅₀ (C5 in 10xIC₅₀ wurde nicht gemessen) eine erhöhte Phosphorylierung von Aurora A und Aurora B detektiert. Wie schon bei den NCCIT-Sphäroiden wurde kein Effekt auf Aurora C gemessen. Das Ergebnis stimmt mit den RPPA-Daten überein; analog zum Western Blot wurde dort die Phosphorylierung durch C2 in niedriger Dosierung, nicht aber in hoher Dosierung beeinflusst.

Im Western Blot widergespiegelt wurden auch die RPPA-Ergebnisse von Rb. Durch C5 kam es zu einer erhöhten Phosphorylierung (S807/S811), C2 in 10xIC₅₀ führte zu keiner Veränderung. Besonders drastische Effekte zeigten C1 und C2 in 100xIC₅₀: Hier ging der Phosphorylierungsgrad auf null zurück.

Des Weiteren konnte die erhöhte Phosphorylierung von Histone H3 (T11) in den HT-29-Sphäroiden nach Behandlung mit C5 mittels Western Blot bestätigt werden. Auch die erhöhte Phosphorylierung von S6 konnte im Western Blot nachvollzogen werden und spiegelt die Ergebnisse des RPPA wider.

5. Diskussion

Tumorerkrankungen sind hochkomplexe Krankheiten, welche die Medikamentenentwicklung vor große Herausforderungen stellen. Medikamente, die gegen ein spezifisches Zielprotein entwickelt wurden, zeigen häufig zusätzliche Effekte, welche die Wirksamkeit des Medikaments entweder verstärken oder aber zu starken Nebenwirkungen führen können. Diese sekundären Effekte werden oft erst in späten klinischen Phasen der Medikamentenentwicklung sichtbar und können im schlimmsten Fall die Weiterentwicklung des Medikaments verhindern. So liegt in der Onkologie die Erfolgsrate von Wirkstoffkandidaten in den klinischen Phasen bei nur 5 % (Collins und Workman 2006). Um diese zu erhöhen, ist es nötig, die Wirkstoffe bereits in frühen präklinischen Phasen ausgiebig zu charakterisieren. Hierfür ist eine umfassende Analyse der Proteinexpression sowie der Aktivität von Signalwegproteinen nötig. Durch Aktivitätsanalysen von Schlüsselproteinen in verschiedenen Signalwegen kann ein detailliertes Wirkprofil von Medikamentenkandidaten erstellt werden.

Wenn möglich sollten diese Analysen bereits in präklinischen Phasen an Modellen erfolgen, die dem Menschen sehr ähnlich sind, idealerweise also direkt an menschlichen Zellen. Die klassische zweidimensionale Zellkultur, die bislang zum Einsatz kommt, trägt diesen Anforderungen nicht Rechnung, da diese Zellen durch ihren immortalisierten dedifferenzierten Zustand stark von Patientenmaterial abweichen; ihnen fehlen elementare Charakteristika, die komplexe Gewebestrukturen aufweisen. Auch Tierversuche mit menschlichen Tumorzellen, wie im subkutanen Mausmodell, können die komplexe Tumorsituation im Menschen nur unzureichend widerspiegeln und benötigen zudem viele Versuchstiere. Die 3D-Sphäroidtechnologie erscheint als hoffnungsvolle Variante.

Sphäroide stellen dreidimensionale zelluläre Strukturen dar, die humane Mikrotumoren imitieren (Bachmeier *et al.* 2005, van den Engel *et al.* 2006, Gaedtker *et al.* 2007). Sie können aus Zelllinien oder aus primärem Patientenmaterial generiert werden und sind der klassischen Zellkultur in Monolayer sowie dem subkutanen Mausmodell überlegen (Mayer *et al.* 2001). Mit diesem dreidimensionalen Modell ist es möglich, Wirkstoffkandidaten auf Material, welches dem Tumor stark ähnelt, ausführlich zu charakterisieren. Da Sphäroide jedoch aus nur wenigen tausend Zellen bestehen, sind äußerst sensitive Methoden nötig, um umfassende Proteinprofile zu erstellen. Hier stoßen viele Analysetechniken an ihre Grenzen. Zwar ist eine histologische Analyse der Sphäroide möglich und einzelne Western Blots können durchgeführt werden, für eine umfassende Analyse, beispielsweise durch Massenspektrometrie-basierte Verfahren, ist aber nicht annähernd genügend Material verfügbar. In dieser Arbeit wurden deshalb *Reverse Phase* Protein-Mikroarrays

(RPPA) verwendet, um in Sphäroiden umfassende Aktivierungsprofile nach Behandlung mit neuartigen Wirkstoffkandidaten zu erstellen. Diese Technologie eignet sich besonders gut zur Analyse von Sphäroiden, da sie mit geringsten Proteinmengen auskommt. Die Detektionsgrenze des Systems liegt bei 1000 Proteinkopien pro Mikrospot, trotzdem waren diverse Systemanpassungen nötig, um mit diesen kleinsten Proteinmengen arbeiten zu können.

Nach erfolgreicher Methodenetablierung wurden mit diesem System die Wirkmechanismen neuartiger Antitumorsubstanzen analysiert. Die verwendeten Sphäroide entstammten der kolorektalen Adenokarzinomzelllinie HT-29 sowie der pluripotenten Stammzelllinie NCCIT. Die Sphäroidlysate wurden als Protein-Mikroarray auf einem planaren Objektträger immobilisiert, wodurch bis zu 80 Proben parallel analysiert werden konnten. Durch Inkubation mit Antikörpern wurden Proteinexpression sowie Proteinmodifikationen untersucht. Dabei ist die Spezifität der verwendeten Antikörper für die Interpretation der Ergebnisse essentiell. Aus diesem Grund wurden alle eingesetzten Antikörper mittels Western Blot auf relevantem Zelllinienmaterial charakterisiert. Zur Charakterisierung von Anti-Histon-Antikörpern wurde eine neue Methode eingesetzt, mit welcher die Wechselwirkung der Antikörper zu mehrfach modifizierten Histonpeptiden im Detail analysiert werden konnte.

Mittels *Reverse Phase* Protein-Mikroarrays (RPPA) konnten für über 100 Sphäroidproben ausführliche Proteinprofile erstellt werden. Diese umfassen 126 Proteine aus unterschiedlichen Signalübertragungswegen, hervorzuheben ist insbesondere der Nachweis von aktivitätsbestimmenden Phosphorylierungen, Acetylierungen und Methylierungen für etwa 80 Proteine. Von besonderem Interesse bei der Analyse von Antitumorsubstanzen ist der Nachweis von Apoptosemarkern und Proteinen des Zellzyklus sowie die Analyse zentraler Signalwege wie MAPK und mTOR.

Bei den untersuchten Antitumorsubstanzen handelte es sich um einen Kinesin-Inhibitor sowie zwei Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi). Die HDACi stammen aus den Klassen der Hydroxamsäuren und Benzamide, der eingesetzte Kinesin-Inhibitor inhibiert spezifisch das mitotische Kinesin Eg5. Da bei diesen Substanzklassen Effekte auf Histone bereits bekannt waren, wurde ein Augenmerk auf die Analyse von Histonmodifikationen gelegt.

Im Folgenden werden zuerst die Methodenetablierung und die damit verbundenen Anpassungen des RPPA-Systems an die Sphäroide diskutiert, des Weiteren wird die Charakterisierung der modifikationsspezifischen Anti-Histon-Antikörper dargestellt.

Anschließend werden im Detail die Wirkprofile der drei untersuchten Antitumorsubstanzen auf Sphäroide der Zelllinien HT-29 und NCCIT diskutiert.

5.1 Methodenetablierung

5.1.1 Kombination von Sphäroid- und RPPA-Technologie

Die Kombination von Sphäroid- und RPPA-Technologie stellt einen sehr interessanten und aussichtsreichen Weg zur detaillierten Analyse der Wirkmechanismen neuer Medikamentenkandidaten dar. Sphäroide zeichnen sich durch Charakteristika aus, die denen von Mikrotumoren stark ähneln. Sie können direkt aus primärem Patiententumormaterial generiert werden und lassen somit bereits in der präklinischen Entwicklung eine Charakterisierung von Substanzen auf tumornahem humanem Material zu. Da Sphäroide aus nur einigen tausend Zellen bestehen, ist die Proteinanalyse mittels hochsensitiver RPPA die Methode der Wahl, die geringe Proteinmenge machte aber trotzdem eine Adaptation der RPPA-Technologie erforderlich.

In ersten Versuchen wurde die minimal benötigte Menge an Sphäroiden für die RPPA-Analysen bestimmt. Durch Anpassung der Arraygenerierung konnte die Zahl auf 3-10 Sphäroide reduziert werden. Dabei wurde deutlich, dass Sphäroide in Abhängigkeit der verwendeten Zelllinien und der Generierungsmethode starke Unterschiede im Proteingehalt aufweisen. Während Sphäroide aus der Zelllinie HT-29 ca. 9 µg Protein pro Sphäroid lieferten, waren es bei den Sphäroiden aus NCCIT-Zellen nur ca. 3 µg, die primären Patienten-Sphäroide lieferten ca. 4 µg Protein. Außerdem konnte gezeigt werden, dass NCCIT-Sphäroide ein anderes Wachstumsverhalten zeigen als HT-29-Sphäroide. Während letztere über die Behandlungsdauer eine konstante Größe beibehielten, wuchsen die NCCIT-Sphäroide weiter und nach 48 h hatte sich ihr Proteingehalt mehr als verdoppelt.

Eine Schwierigkeit stellte die reproduzierbare Sphäroidlyse dar. Die Lysate sollten aus wenig Zellmaterial mit möglichst wenig Puffer generiert werden, um hohe Proteinkonzentrationen für die RPPA-Analyse zu erhalten. Dadurch wurde die Methode besonders anfällig für kleine Volumenunterschiede, wie sie bei der Ernte der Sphäroide entstehen, und die Lyseeffizienz schwankte, abhängig vom Restvolumen an Waschpuffer, stark. Aus diesem Grund wurde ein Verfahren entwickelt, bei welchem die Sphäroide vor der Lyse gefriergetrocknet werden. So konnten die Varianzen zwischen den Replikaten reduziert und die Lyseeffizienz gesteigert werden. Besonders nukleäre Proteine wurden

deutlich besser solubilisiert, da durch Trocknung des salzhaltigen Waschpuffers die Salzkonzentration des Lysats erhöht wurde. Dieser Effekt zeigte sich besonders nützlich für die Extraktion von Histonen und die Analyse von Histonmodifikationen. Phosphatasen wurden im Verlauf der Gefriertrocknung nicht aktiviert, was sich daran zeigte, dass die Phosphorylierung von Proteinen nicht reduziert wurde. Das Lyseprotokoll konnte durch den Lyophilisierungsschritt optimiert werden und sowohl die Lyseeffizienz als auch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde verbessert. Mit diesem neu etablierten Lyseprotokoll konnten neben HT-29 und NCCIT-Sphäroiden auch primäre Patienten-Sphäroide analysiert werden.

Mit der hier etablierten Methode können individuelle Expressions- und Aktivierungsmuster in Tumoren aufgezeigt und somit gezielt therapiert werden. Bereits vor Beginn einer nebenwirkungsreichen Therapie kann die Wirksamkeit von Medikamenten auf primären patientenspezifischen Sphäroiden getestet werden, um Patienten zu stratifizieren. Außerdem kann dieses System in der präklinischen Medikamentenentwicklung eingesetzt werden, um detaillierte Wirkprofile auf tumornahem Material zu generieren.

5.1.2 Einsatz eines mikrosphärenbasierten Peptidarrays zur

Charakterisierung modifikationsspezifischer Anti-Histon-Antikörper

Die Verfügbarkeit hochspezifischer Antikörper gegen modifizierte Histone ist für viele Anwendungen essentiell. Methoden wie Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) und MS-basierte Proteomanalysen acetylierter Proteine sind auf modifikationsspezifische Antikörper angewiesen, da unspezifische Bindungen zu verfälschten Ergebnissen führen (Kuo und Allis 1999, Impey *et al.* 2004, Nelson *et al.* 2006, Barski *et al.* 2007, Choudhary *et al.* 2009, Choudhary und Mann 2010). Auch die in dieser Arbeit verwendeten *Reverse Phase* Protein-Mikroarrays basieren auf der Spezifität der eingesetzten Antikörper.

Bei der Analyse von Histonen können mehrfache Modifikationen im Antikörperepitop auftreten, was die Bindungseigenschaften des Antikörpers beeinflussen und somit die Ergebnisse verfälschen kann. Daher wurden bereits verschiedene Methoden zur detaillierten Analyse der Bindecharakteristika von Anti-Histon-Antikörpern entwickelt (Bua *et al.* 2009, Bock *et al.* 2011). Peptidarrays mit multiplen posttranslationalen Modifikationen gehören zu den bedeutendsten Techniken, um Bindeinformationen von Antikörpern zu erfassen. Dabei werden unterschiedlich modifizierte Peptide auf planaren Glasobjektträgern immobilisiert und durch Inkubation mit Anti-Histon-Antikörpern werden deren Bindungscharakteristika analysiert. Die Herstellung planarer Peptidarrays ist jedoch relativ aufwändig und daher teuer. Im Folgenden soll die Anwendung eines

mikrosphärenbasierten Peptidarrays dargestellt werden, welcher sich durch eine hohe Durchsatzfähigkeit bei stark minimiertem Arbeitsaufwand auszeichnet (Heubach *et al.* 2013).

Der verwendete Peptidarray besteht aus kovalent auf Mikrosphären gekoppelten Peptiden, die mittels Spot-Synthese synthetisiert wurden (Kurzeder *et al.* 2007, Sylvester und Kron 2010, Hoeppe *et al.* 2011). Die 379 Peptide des Arrays entsprechen den N-terminalen Schwänzen der Histone H2A, H2B, H3 und H4 und liegen an bis zu vier Aminosäuren acetyliert, methyliert, phosphoryliert oder citrulliniert vor (Bock *et al.* 2011). Mit diesem mikrosphärenbasierten Peptidarray wurden 42 kommerziell erhältliche Antikörper im Detail charakterisiert. Nur jeder fünfte Antikörper erwies sich dabei als selektiv für das vom Hersteller angegebene Epitop. Bei 40 % der Antikörper konnten zusätzlich leichte Nebenreaktionen zu einer anderen Modifikation nachgewiesen werden. Weitere 40 % der getesteten Antikörper zeigten starke Kreuzreaktivitäten zu anderen Modifikationen oder keine Bindung zu der vom Hersteller spezifizierten Modifikation. Dieses Ergebnis verdeutlicht die Wichtigkeit der Qualitätskontrolle für modifikationspezifische Anti-Histon-Antikörper.

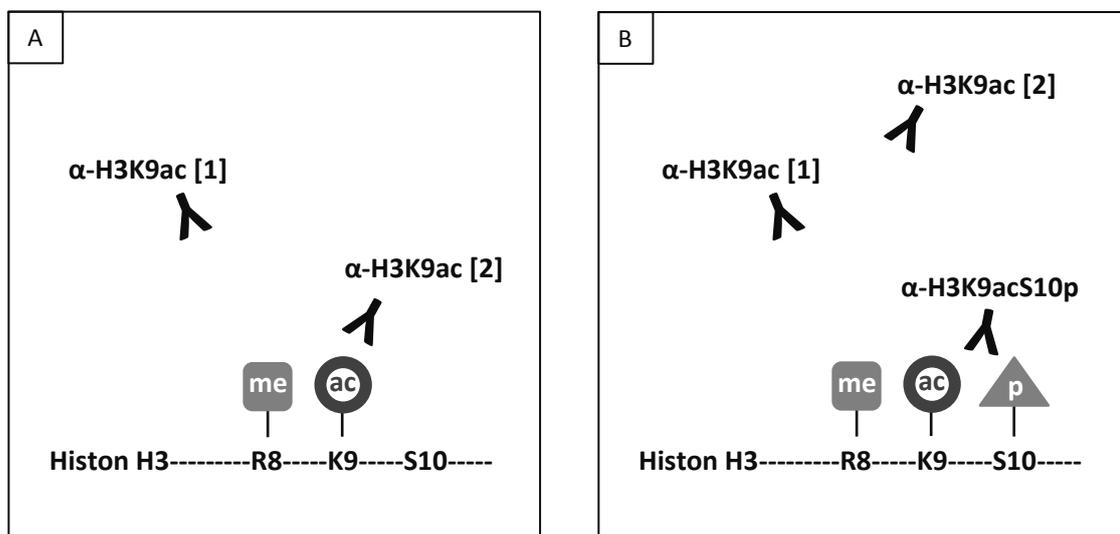


Abbildung 31: Analyse der Bindungscharakteristika von Anti-Histon-Antikörpern

Bindungseigenschaften von modifikationspezifischen Anti-Histon H3-Antikörpern gegen acetyliertes Lysin 9 und die Doppelmodifikation an Lysin 9 und Serin 10 wurden mittels Peptidarrays analysiert. Die 379 Peptide des mikrosphärenbasierten Arrays entsprechen den N-terminalen Schwänzen von Histone H2A, H2B, H3 und H4 und liegen an bis zu vier Aminosäuren durch Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung oder Citrullinierung modifiziert vor. A) Die beiden Anti-Histon H3 K9ac-Antikörper binden ihr Epitop, solange keine benachbarte Aminosäure modifiziert vorliegt. Durch Methylierung von Arginin 8 kann Anti-Histon H3 K9ac [1] sein Epitop nicht mehr binden, wohingegen die Epitopbindung von Anti-Histon H3 K9ac [2] nicht gestört wird. B) Durch Phosphorylierung von Serin 10 wird die Bindung beider Anti-Histon H3 K9ac-Antikörper an ihr Epitop verhindert. Nur der Antikörper gegen die Doppelmodifikation (Anti-Histon H3 K9acS10p) bindet sein Epitop weiterhin. Abkürzungen: p – phospho, ac – acetyl, me – methyl

Die Bindeeigenschaften modifikationsspezifischer Anti-Histon-Antikörper können durch Modifikationen benachbarter Aminosäuren, wie sie in Histonschwänzen häufig vorkommen, beeinträchtigt werden. Detaillierte Informationen über nachbarschaftsspezifische Bindungseigenschaften und somit Erkenntnisse über vorteilhafte oder nachteilige Modifikationen in der näheren Umgebung konnten mithilfe dieses Peptidarrays generiert werden.

Am Beispiel zweier Antikörper gegen acetyliertes Histon H3 (K9) konnte die Bedeutung des Peptidarrays aufgezeigt werden (Abbildung 31). Die Analyse zeigte für beide Antikörper eine starke Affinität für die an Lysin 9 acetylierten Peptide. Durch Phosphorylierung am benachbarten Serin (S10) wurde hingegen die Bindung beider Antikörper negativ beeinflusst: Doppelt an Lysin 9 und Serin 10 modifizierte Peptide wurden von keinem der Antikörper erkannt. Ein dritter Antikörper, spezifisch gegen diese Doppelmodifikation (K9acS10p), zeigte hingegen eine deutliche Bindung zu diesen Peptiden. Entgegen der Herstellerangaben erkannte er aber auch Peptide mit alleiniger Acetylierung an Lysin 9, jedoch nicht die alleinige Phosphorylierung an Serin 10.

Um die Relevanz dieser Beobachtungen zu zeigen, wurden HeLa-Zelle extrakte nach Behandlung mit den antimetabolischen Substanzen Paclitaxel (Taxol) und Colcemid analysiert. Diese Substanzen beeinträchtigen die Mikrotubuliorganisation und führen zum Zellzyklusarrest in der Metaphase. Als Konsequenz des Arrests kommt es zur verstärkten Phosphorylierung von Histon H3 an Serin 10 (Rieder und Palazzo 1992, Jordan *et al.* 1996, Yvon *et al.* 1999, McManus und Hendzel 2006).

Eine verstärkte Phosphorylierung von Serin 10 durch Behandlung der Zellen mit Paclitaxel und Colcemid konnte im Western Blot gezeigt werden. Die beiden Anti-Histon H3 K9ac-Antikörper zeigten einen deutlichen Signalabfall bei den behandelten Zellen, was auf eine verringerte Acetylierung an Lysin 9 hindeutete. Das Signal des Anti-Histon H3 K9acS10p-Antikörpers nahm im Western Blot zu. Diese Ergebnisse lassen sich erst durch Einbeziehung des Peptidarrays korrekt interpretieren.

Im Peptidarray zeigte der Antikörper gegen doppelt modifiziertes Histon H3 (K9acS10p) keine Reaktivität mit Peptiden, die nur an Serin 10 modifiziert vorlagen. Daher muss dem im Western Blot detektierten Signal eine Acetylierung an Lysin 9 zugrunde liegen. Die beiden Antikörper gegen acetyliertes Lysin 9 zeigten im Western Blot jedoch ein reduziertes Signal. Im Peptidarray war für beide Antikörper aber eine Insensitivität gegenüber doppelt modifizierten Peptiden (K9acS10p) detektiert worden. Dies deutet darauf hin, dass die Epitopbindung der Antikörper durch die Paclitaxel- und Colcemid-induzierte Phosphorylierung von Serin 10 verhindert wird.

Somit ergibt die Kombination der Informationen aus Peptidarray und Western Blot ein schlüssiges Bild der Modifikationsänderungen: Bedingt durch die Behandlung der

HeLa-Zellen mit Paclitaxel und Colcemid kommt es zu einer erhöhten Phosphorylierung an Serin 10, wodurch die Bindung der beiden Anti-Histon H3 K9ac-Antikörper an ihr Epitop verhindert wird und der Eindruck entsteht, dass die Acetylierung an Lysin 9 reduziert wird. Dieses Beispiel zeigt, wie wichtig eine detaillierte Analyse der Bindungseigenschaften modifikationsspezifischer Anti-Histon-Antikörper für die korrekte Interpretation der Ergebnisse ist. Der hier beschriebene Peptidarray ist somit eine wirksame Methode, um die korrekte Interpretation epigenetischer Analysen zu gewährleisten.

Mit diesen methodischen Arbeiten war nun die Basis gelegt, um komplexe Proteinprofile von Sphäroiden zu generieren. Die RPPA-Methode war an die Sphäroide mit ihren kleinen Zellzahlen adaptiert und die zur Analyse eingesetzten Antikörper im Detail charakterisiert worden. Auf diese Grundlagen aufbauend konnte nun die Wirkung dreier proprietärer Antitumorsubstanzen der 4SC AG, die sich in späten Entwicklungsphasen befinden, auf Sphäroiden analysiert werden.

5.2 Analyse der Wirkung eines neuartigen Kinesin-Inhibitors

Antimitotika werden häufig zur Behandlung von Tumoren eingesetzt und wirken durch gezielte Störung des Spindelapparats, welcher für eine erfolgreiche Mitose und Zellteilung benötigt wird. Ein Ziel antimitotischer Medikamente stellen Mikrotubuli dar, deren Abbau beispielsweise durch Paclitaxel (Taxol) inhibiert wird, wohingegen Vincaalkaloide ihren Aufbau inhibieren. Da den Mikrotubuli aber auch außerhalb der Mitose eine wichtige Rolle zukommt, werden nicht nur stark proliferierende Tumorzellen von diesen Substanzen getroffen und es kommt oft zu schweren Nebenwirkungen. Wirkstoffe gegen mitosespezifische Zielproteine, beispielsweise das Kinesin Eg5, stellen eine vielversprechende Alternative dar.

Bei der proprietären Leitstruktur C5 der 4SC AG handelt es sich um einen Kinesin-Inhibitor, welcher spezifisch Eg5 inhibiert. Eg5 spielt als mitotisches Kinesin eine zentrale Rolle beim Spindelaufbau in der Mitose. Das Motorprotein Eg5 bewegt sich zum Plusende der Mikrotubuli hin und ist für die Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen essentiell. Durch Inhibition von Eg5 wird die Separation der Zentrosomen verhindert und es kommt zur Ausbildung monastraler Spindeln. Bipolare Spindeln, welche für die korrekte Aufteilung der Chromosomen in die Tochterzellen nötig wären, können hingegen nicht ausgebildet werden (Valentine *et al.* 2006, Huszar *et al.* 2009).

Eg5 wirkt als Antriebsmotor für die vollständige Separation der Zentrosomen. Nach Eintritt der Zellen in die Mitose wird die Zentrosomenseparation durch Phosphorylierung von *Linker*-Proteinen durch Aurora A und PLK1 initiiert (Macûrek *et al.* 2008, Mardin *et al.* 2011). PLK1 ist essentiell für die Akkumulation von Eg5 an den Spindelpolen (Mardin *et al.* 2011). Wahrscheinlich führt PLK1 über die Nek9/6/7-Kaskade zur Phosphorylierung von Eg5 an Serin 1033 und somit zu dessen Akkumulation an den Zentrosomen (Bertran *et al.* 2011). Dort kommt es durch Cdk1 zur Phosphorylierung von Eg5 an Threonin 928, woraufhin Eg5 an Mikrotubuli bindet (Blangy *et al.* 1995).

Wird Eg5 inhibiert, so kommt es nicht zur Separation der Zentrosomen und monastrale Spindeln werden ausgebildet. Im Gegensatz zu bipolaren Spindeln wird an den Kinetochoren eine verringerte Zugspannung detektiert und der Spindel-Kontrollpunkt SAC (*spindle assembly checkpoint*) wird aktiviert (Mayer 1999, Kapoor *et al.* 2000). SAC verhindert bei inkorrekt an die Chromosomen ein Fortschreiten der Mitose zwischen Metaphase und Anaphase und führt zu einem Arrest der Zellen in der Metaphase. Der Spindel-Kontrollpunkt ist einer von drei Hauptkontrollpunkten im Zellzyklus. Weitere Kontrollpunkte befinden sich vor Eintritt der Zelle in die S-Phase sowie die M-Phase, wobei jeweils kontrolliert wird, ob alle nötigen Bedingungen für das korrekte Fortschreiten des Zellzyklus erfüllt sind (Elledge 1996). Ist dies nicht der Fall, so wird der Zellzyklus bis zur Erfüllung der Bedingungen am Kontrollpunkt gestoppt. Werden die Bedingungen längerfristig nicht erfüllt, kann Apoptose induziert werden. Somit handelt es sich bei Eg5 um ein attraktives Zielmolekül für neuartige Antitumorsubstanzen.

Der Mitosearrest der Zellen nach Behandlung mit Antimitotika hat weitreichende Änderungen der Signalübertragung zur Folge. Die Untersuchung der HT-29-Sphäroide nach Behandlung mit dem Kinesin-Inhibitor C5 zeigte besonders starke Effekte auf die Phosphorylierung verschiedener Proteine. Sehr auffällig war die starke Phosphorylierung von Histon H3 an Serin 10, Threonin 11 und Serin 28. Diese Histonmodifikationen sind insbesondere in der Mitose beschrieben, wo sie trotz unterschiedlicher Kinetiken alle in der Metaphase ihren Höhepunkt erreichen (McManus und Hendzel 2006). Während der Phosphorylierung an Serin 10 vor allem bei der Chromosomenkondensation eine wichtige Rolle zukommt, wurde für Threonin 11 eine Rolle beim Kinetochor-Aufbau und dem Kontrollpunkt zwischen Metaphase und Anaphase postuliert (Van Hooser *et al.* 1998, Zhou *et al.* 2008a).

Eine verstärkte Phosphorylierung von Histon H3 in HT-29-Zellen nach Behandlung mit anderen Eg5-Inhibitoren konnte bereits gezeigt werden. Tao *et al.* (2005) detektierten mit KSP-IA eine stark erhöhte, mitosespezifische Phosphorylierung von Histon H3, Birk *et al.*

(2012) eine erhöhte Phosphorylierung von Histon H3 an Serin 10 nach Behandlung mit Ispinesib.

Die in dieser Arbeit detektierten Phosphorylierungen von Histon H3 an Serin 10, Threonin 11 und Serin 28 deuten stark in Richtung Metaphase, wobei alle Modifikationen auch in der Interphase beschrieben sind. Für eine Metaphase-abhängige Phosphorylierung spricht insbesondere die Aktivität von Aurora B, welche Histon H3 während der Mitose an Serin 10 und Serin 28 phosphoryliert (Hsu *et al.* 2000, Giet und Glover 2001). Sowohl Aurora B als auch Aurora A lagen nach Behandlung mit C5 erhöht vor und ihre Aktivierung durch Phosphorylierung (T232/T288) nahm zu, was mittels RPPA und Western Blot gezeigt werden konnte. Beide Kinasen sind in Tumoren oft überexprimiert und spielen wichtige Rollen bei der Zellzyklusregulation. Die Expression und Aktivität von Aurora A gipfelt in der Pro-Metaphase, die von Aurora B in der Metaphase (Dar *et al.* 2010).

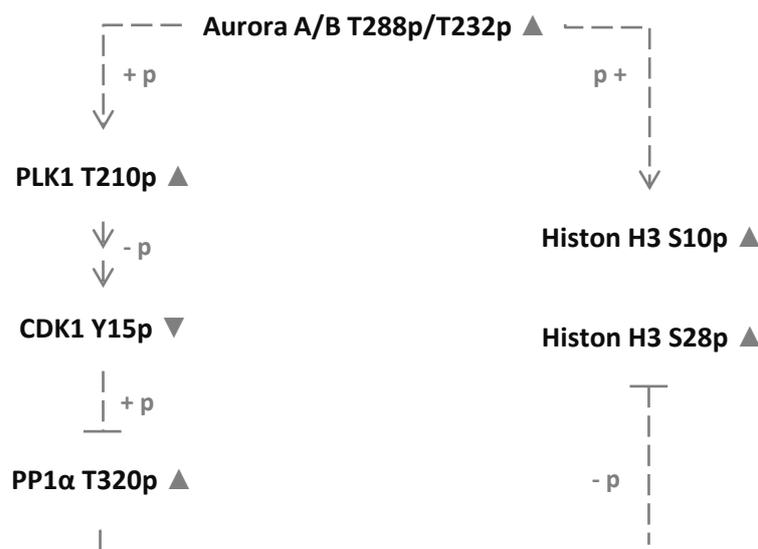


Abbildung 32: Mitosearrest der HT-29-Zellen nach Behandlung mit einem Eg5-Inhibitor

Die Behandlung von HT-29-Sphäroiden mit dem proprietären Eg5-Inhibitor der 4SC AG (C5) hatte die Induktion von Mitosemarkern zur Folge: Neben der Phosphorylierung von Aurora A und B wurde flussabwärts PLK1 verstärkt phosphoryliert und die Phosphorylierung von CDK1 verringert. Dies hat eine reduzierte Aktivität der regulatorischen Phosphatase PP1 α und somit eine verstärkte Phosphorylierung von Histon H3 an Serin 28 zur Folge. Parallel dazu wird Histon H3 an Serin 10 und Serin 28 durch Aurora B phosphoryliert. Der in dieser Arbeit mittels RPPA detektierte Regulationszustand ist anhand der Dreiecke ersichtlich.

Abkürzungen: ▲ – Hochregulation, ▼ – Herunterregulation, p – phospho

Aurora A ist in der G2-Phase des Zellzyklus als Kinase von PLK1 bekannt. Die aktivierende Phosphorylierung von PLK1 (T210) beginnt in G2, gipfelt in der Metaphase und fällt zur Anaphase hin wieder ab (Macúrek *et al.* 2008). PLK1 wiederum phosphoryliert Regulatoren des CDK1-Cyclin B1-Komplexes, welcher den Eintritt in die

M-Phase des Zellzyklus initiiert (Strebhardt 2010). Unter anderem wird Cdc25C aktiviert; die aktivierende Phosphatase von CDK1 führt zur reduzierten Phosphorylierung von CDK1 (Y15) (Roshak *et al.* 2000).

Durch Behandlung der HT-29-Sphäroide mit C5 wurde neben den Aurorakinasen auch PLK1 verstärkt phosphoryliert (Abbildung 32). Analog zu den beschriebenen Zusammenhängen zwischen Aurora A, PLK1 und CDK1 wurde eine leicht verringerte Phosphorylierung an CDK1 detektiert, was somit auf eine Initiation der M-Phase hinweist. Des Weiteren konnte eine erhöhte inhibierende Phosphorylierung von PP1 α beobachtet werden. Reguliert wird die Aktivität der regulatorischen Phosphatase PP1 durch eine inhibierende Phosphorylierung an Threonin 320, welche durch CDK1 erfolgt und vor allem während der Mitose erhöht ist (Kwon *et al.* 1997). PP1 führt als Phosphatase von Histon H3 nach Trennung der Chromosomen wahrscheinlich zur Dephosphorylierung von Serin 10 und Serin 28 (Goto *et al.* 2002).

Zusammenfassend führt der Kinesin-Inhibitor C5 in den HT-29-Sphäroiden somit zur erhöhten Phosphorylierung von Histon H3, zur Aktivierung von Aurora A/B, PLK1 und CDK1 und zur Inaktivierung der regulatorischen Phosphatase PP1 α (Abbildung 32). All diese Modifikationen verstärken sich gegenseitig und sind insbesondere in der Metaphase zu finden. Die deutliche Induktion dieser Metaphasemarker zeigt, dass sich die Mehrheit der Zellen in der Metaphase befindet und nicht mehr zufällig verteilt in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus. Die Behandlung der Zellen hat somit zu einer Synchronisation der Zellen geführt: Die Zellen wurden in der Metaphase arretiert. Dies ist ein typischer, in der Literatur beschriebener Mechanismus für Kinesin-Inhibitoren, eine Wirkstoffklasse, in die auch der Eg5-Inhibitor C5 fällt.

Ein bereits gut charakterisierter Eg5-Inhibitor ist Monastrol, welcher durch Arrest der Zellen in der Mitose eine spezifische und reversible Zellzyklusblockade bedingt (Mayer 1999). Die Inhibition von Eg5 führt zur Ausbildung monastraler Spindeln, deren labile Bindung an die Kinetochore den Spindel-Kontrollpunkt aktiviert, wodurch die Zellen in der Metaphase gehalten werden (Mayer 1999, Kapoor *et al.* 2000). Der Kontrollpunkt kann erst überwunden werden, wenn alle Kinetochore stabil von Mikrotubuli gebunden sind. Solange verhindern die rekrutierten Proteine Bub1, BubR1, Bub3, Mad1 und Mad2 die Progression des Zellzyklus, indem sie die Ubiquitinligase-Aktivität des Anaphase-promovierenden Komplexes APC (*anaphase-promoting complex*) inhibieren. Somit wird unter anderem Cyclin B nicht proteolytisch abgebaut, was für die Initiation der Anaphase essentiell wäre (Burke und Stukenberg 2008).

Verschiedene Zelllinien reagieren unterschiedlich auf die Behandlung mit antimitotischen Substanzen. So kommt es zwar stets zu einer Aktivierung des Spindel-Kontrollpunkts und somit zu mitotischem Arrest der Zellen, dieser führt jedoch nur teilweise zum Zelltod in der Mitose. Mitunter wird die Mitose auch ohne Zellteilung beendet, was zum Tod der Zellen in der Interphase, einem erneuten Zyklusarrest oder aber zur weiteren Genomreplikation und somit zu aneuploiden Zellen führen kann (Rieder und Maiato 2004, Kops *et al.* 2005). Zur Erklärung der unterschiedlichen Zellschicksale postulierten Gascoigne und Taylor (2008) eine Konkurrenz zwischen mitotischer Abweichung und Apoptoseinduktion. Sie zeigten während des mitotischen Arrests einen stetigen Abfall des Cyclin B1-Niveaus bei gleichzeitig ansteigenden Apoptosesignalen und postulierten unterschiedliche Kinetiken und Schwellenwerte abhängig vom genetischen Hintergrund der Zellen und daraus resultierend unterschiedliche Zellschicksale. Durch Behandlung von HT-29-Zellen mit dem Eg5-Inhibitor AZ138 wurde zuerst der Schwellenwert der Apoptoseinduktion erreicht, bevor das reduzierte Cyclin B1-Niveau zu mitotischer Abweichung führte. Somit zeigten die Zellen einen mitotischen Arrest mit induzierter Apoptose. Dieser Effekt war jedoch stark konzentrationsabhängig: Während hohe Konzentrationen zur Apoptose führten, kam es durch geringere Konzentrationen nur bei wenigen Zellen zum Zelltod in der Mitose (Gascoigne und Taylor, 2008).

Tao *et al.* (2005) zeigten durch den Eg5-Inhibitor KSP-IA in HT-29-Zellen einen anhaltenden, SAC-abhängigen mitotischen Arrest, jedoch ohne Apoptoseinduktion. Leizerman *et al.* (2004) detektierten in HT-29-Zellen durch Monastrol eine erhöhte Apoptoserate, allerdings nur schwache Effekte auf die Spaltung der Caspasen 3 und 8 sowie PARP. Zur Apoptoseinduktion war in HT-29-Zellen eine deutlich höhere Monastrol-Konzentration nötig als beispielsweise in HCT-116-Zellen.

Ein deutlich erhöhter mitotischer Index war in mehreren Publikationen nach Behandlung von HT-29-Zellen mit Eg5-Inhibitoren detektiert worden (Kops *et al.* 2005). Shi *et al.* (2008) zeigten einen hohen mitotischen Index nach Behandlung mit dem Eg5-Inhibitor K51, wohingegen der apoptotische Index sowie die Zytotoxizität eher gering waren. Birk *et al.* (2012) untersuchten die Wirkung des Eg5-Inhibitors Ispinesib auf verschiedene Zelllinien. Hierbei war der mitotische Index in HT-29-Zellen am höchsten, obwohl die Zellen vergleichsweise langsam in Apoptose gingen.

Das in dieser Arbeit detektierte Phosphorylierungsprofil deutet stark auf einen mitotischen Arrest der Zellen nach Behandlung mit dem Eg5-Inhibitor C5 hin, allerdings konnte keine verstärkte Expression oder Aktivierung von Apoptosemarkern gezeigt werden. Untersucht wurden neben den Caspasen 3 und 8 auch PARP sowie verschiedene Proteine des intrinsischen Apoptosewegs. Somit konnte in den HT-29-Zellen analog zu Tao *et al.* keine Apoptoseinduktion nach Behandlung mit dem Eg5-Inhibitor detektiert werden. Bei

Gascoigne und Taylor wie auch bei Leizerman *et al.* wurde zwar eine Apoptoseinduktion gemessen, jedoch wurde auch die Konzentrationsabhängigkeit der Effekte deutlich. Laut Gascoigne und Taylor bestimmt außerdem das Gleichgewicht zwischen Cyclin B1-Proteolyse und Apoptoseinduktion das Zellschicksal. Möglicherweise war nach 46-stündiger Behandlung der HT-29-Sphäroide mit C5 der Schwellenwert der Apoptoseinduktion noch nicht erreicht und das Schicksal der HT-29-Zellen wird erst nach längeren Behandlungsdauern bzw. bei höheren Behandlungskonzentrationen entschieden. Auch die anderen zitierten Arbeiten unterstützen den in dieser Arbeit gefundenen Mitosearrest sowie die Insensitivität von HT-29-Zellen auf Apoptoseinduktion. Möglicherweise könnte durch eine erhöhte Behandlungskonzentration bzw. durch eine verlängerte Behandlungsdauer die Apoptoseinduktion begünstigt werden. Auf einer anderen Zelllinie konnten durch die Substanz C5 bereits in 20-fach geringerer Wirkstoffkonzentration nach 48 h deutliche apoptotische Effekte beobachtet werden (unveröffentlichte Ergebnisse der 4SC AG). Dies spricht dafür, dass die durch C5 nicht detektierbare Apoptoseinduktion auf die Charakteristika der Zelllinie HT-29 zurückzuführen ist.

In dieser Arbeit konnte eine Vielzahl von Proteinen nach Behandlung mit C5 verstärkt phosphoryliert detektiert werden. Auffällig ist, dass viele dieser Proteine über den mTOR-Signalweg miteinander verknüpft sind.

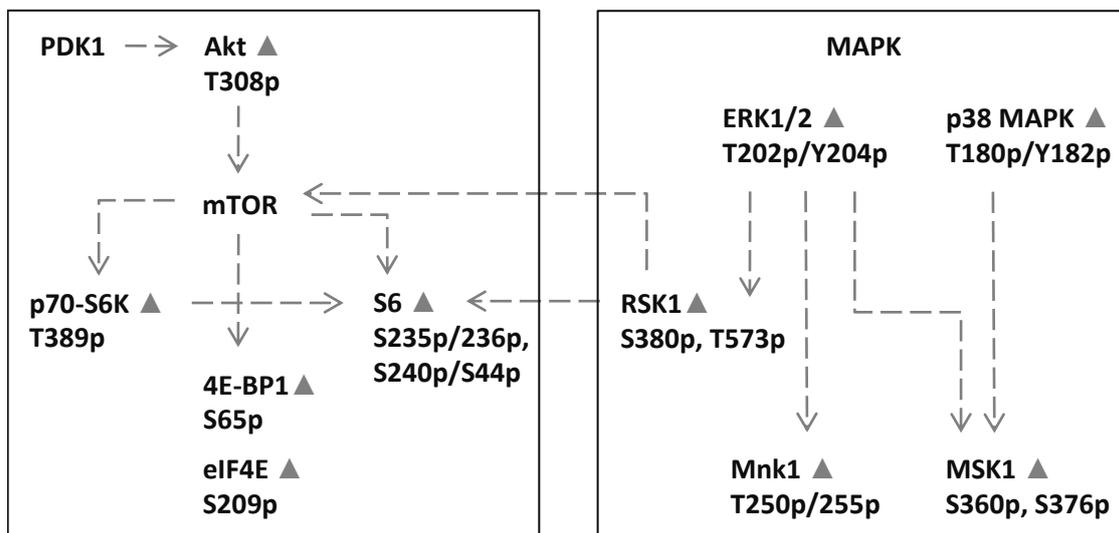


Abbildung 33: Aktivierung der mTOR- und MAPK-Signalwege durch den Eg5-Inhibitor
 Durch Inkubation der HT-29-Sphäroide mit dem Eg5-Inhibitor wurden einige Proteine der proliferativen Signalwege mTOR und MAPK aktiviert. Die Aktivierungen können im Flussdiagramm nachvollzogen werden. Die Dreiecke spiegeln die in dieser Arbeit mittels RPPA detektierten Regulationszustände wider. Die verstärkte Aktivierung von 4E-BP1, p70-S6K und S6 hat die Cap-abhängige Translationsinitiation zur Folge.
 Abkürzungen: ▲ – Hochregulation, ▼ – Herunterregulation

mTOR liegt unter anderem im Proteinkomplex mTORC1 vor, welcher Akt-abhängig oder Ras-ERK-RSK-abhängig aktiviert werden kann (Ma und Blenis 2009, Magnuson *et al.* 2012). Flussabwärts von mTORC1 liegen p70-S6K und 4E-BP1. p70-S6K (T229) wird wie auch Akt (T308) durch PDK1 phosphoryliert (Alessi *et al.* 1997, 1998, Pullen *et al.* 1998). Zur vollständigen Aktivierung muss p70-S6K außerdem durch mTOR an Threonin 389 phosphoryliert werden (Burnett *et al.* 1998, Weng *et al.* 1998).

p70-S6K (T389) lag in dieser Arbeit nach Behandlung der HT-29-Zellen mit C5 verstärkt phosphoryliert vor, was die relative Aktivierung im Verhältnis zum Gesamtprotein zeigte. Auch flussaufwärts von mTOR konnte eine deutlich verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 sowie RSK1 beobachtet werden; ebenso lag Akt verstärkt phosphoryliert vor (Abbildung 33).

mTOR wirkt als kritischer Regulator der Translationsinitiation über 4E-BP1, p70-S6K und das ribosomale Protein S6. Sowohl p70-S6K als auch 4E-BP1 und S6 lagen nach Behandlung mit C5 verstärkt phosphoryliert vor. 4E-BP1 bindet in ruhenden Zellen den Translationsinitiator eIF4E inhibierend und verhindert so die Cap-abhängige mRNA-Translation. Die mTOR-abhängige Phosphorylierung von 4E-BP1 führt jedoch zur Loslösung von eIF4E und es kommt zur Translationsinitiation, was eine verstärkte Proteinsynthese zur Folge hat (Brunn *et al.* 1997, Magnuson *et al.* 2012). Außerdem werden mTOR-abhängig durch p70-S6K sowie ERK-abhängig durch RSK weitere translationsinitiiierende Proteine phosphoryliert. Beide Kinasen phosphorylieren unter anderem das ribosomale Protein S6, wobei die funktionelle Signifikanz dieser Phosphorylierung nicht geklärt ist (Pende *et al.* 2004, Meyuhas 2008, Magnuson *et al.* 2012).

Der Translationsinitiator eIF4E kann durch Mnk1 an Serin 209 phosphoryliert werden, was zur Aktivierung führt, jedoch nicht essentiell für die Translationskontrolle ist (Pyronnet *et al.* 1999, Waskiewicz *et al.* 1999, Ueda *et al.* 2004). Die Kinase von Mnk1 ist wiederum ERK1/2, welche außerdem RSK an Threonin 573 phosphoryliert (Waskiewicz *et al.* 1997, 1999, Dalby *et al.* 1998). ERK1/2, RSK, Mnk1 und eIF4E wurden in dieser Arbeit nach Behandlung mit C5 verstärkt phosphoryliert detektiert, ebenso p38 MAPK, welche gemeinsam mit ERK1/2 für die Phosphorylierung von MSK1 verantwortlich ist (Deak *et al.* 1998). Auch bei MSK1 konnte eine erhöhte Phosphorylierung an Serin 360 und Serin 376 detektiert werden.

Die beobachteten Effekte auf mTOR- und MAPK-Signalwege deuten somit auf eine Aktivierung der Cap-abhängigen mRNA-Translation und damit auf eine erhöhte Proteinexpression hin (Abbildung 33). Diese Beobachtungen stehen in Kontrast zum zuvor diskutierten mitotischen Arrest der Zellen, ausgelöst durch den Eg5-Inhibitor C5.

Möglicherweise sind somit nicht alle Zellen vom mitotischen Arrest betroffen und C5 bewirkt in Zellen in der Interphase eine Translationsinitiation. Hieraufhin deuten auch Ki-67 und Rb, welche durch Behandlung mit C5 in ihrer Expression bzw. Phosphorylierung verändert wurden.

In den mit C5 behandelten HT-29-Sphäroiden konnte eine deutlich erhöhte Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins Rb an Serin 807 und Serin 811 detektiert werden. Diese CDK3/Cyclin C-abhängigen Phosphorylierungen sind für die Transition der Zellen von G0 in G1 essentiell (Sage *et al.* 2003, Ren und Rollins 2004). Des Weiteren wurde eine erhöhte Expression von Ki-67 gemessen. Dieser Marker wird nur in proliferierenden Zellen exprimiert, während in ruhenden Zellen kein Ki-67 detektiert werden kann (Gerdes *et al.* 1984, Endl und Gerdes 2000). Die verstärkte Phosphorylierung von Rb in Kombination mit der erhöhten Expression von Ki-67 könnte somit auf eine C5-bedingte Transition ruhender Zellen aus G0 in den aktiven Zellzyklus hinweisen. Da die Expression von Ki-67 im Laufe des Zellzyklus von der S-Phase zur Mitose hin zunimmt, könnten außerdem mitotisch arretierte Zellen zum erhöhten Ki-67-Niveau beitragen (Scholzen und Gerdes 2000).

Iyer *et al.* (1999) analysierten mittels mRNA-Mikroarrays die Antwort ruhender Fibroblasten auf Serumgabe anhand der Expression von 8613 humanen Genen. Innerhalb von 15 min kam es zur prompten Expression von IEGs (*immediate early genes*, unmittelbar frühe Gene), wie *c-jun* und *c-fos*, welche analog zur Proteinsynthese über ERK1/2 und p38 MAPK induziert werden. Bezogen auf die mit C5 beobachteten Effekte könnte somit die Transition ruhender Zellen aus G0 in den Zellzyklus die induzierte Proteinsynthese zur Folge haben. Möglicherweise werden auch diese vormals ruhenden Zellen im weiteren Verlauf des Zellzyklus in der Metaphase arretiert. Besonders spannend ist diese Beobachtung im Hinblick auf Tumorstammzellen. Tumorstammzellen werden in Zusammenhang mit Metastasierung, erworbener Medikamentenresistenz und Rückfällen gesehen (Vermeulen *et al.* 2012). Von konventionellen Medikamenten werden sie jedoch meist nicht bekämpft, weil diese auf replizierende Zellen abzielen und die in G0 befindlichen Tumorstammzellen somit nicht treffen. Ein möglicher Ansatz, um auch Tumorstammzellen zu therapieren, ist daher die Induktion ihres Eintritts in den Zellzyklus (Li und Bhatia 2011).

Die erhöhte Expression von Ki-67 nach Behandlung mit C5 sowie die für die G0-G1-Transition essentielle Phosphorylierung von Rb (S807/S811) sind erste Anzeichen für einen Eintritt ruhender HT-29-Zellen in den Zellzyklus. Für eine abschließende Aussage müssen diese Hinweise aber durch Analyse weiterer Proteine, welche die G0-G1-Transition beeinflussen, beispielsweise p53, Cyclin C, CDK3 und MEF/ELF4, sowie durch Analyse der C5-Wirkung auf synchronisierte Zellen weiterverfolgt werden

(Ren und Rollins 2004, Li und Bhatia 2011).

Interessant wären außerdem orts aufgelöste Analysen von Sphäroiden, da sich im Sphäroidzentrum ruhende Zellen befinden, während die Zellen in der Peripherie proliferieren (Sutherland 1988). Möglicherweise reagieren somit zwei Zellpopulationen innerhalb der Sphäroide unterschiedlich auf die Behandlung mit C5: Während die ruhenden Zellen im Sphäroidinneren durch Phosphorylierung von Rb in den Zellzyklus überführt werden, werden proliferierende Zellen in den äußeren Sphäroidschichten mitotisch arretiert (Abbildung 34). Orts aufgelöste Analysen in Sphäroiden wurden beispielsweise von Lobjois et al. (2009) durchgeführt und zeigten bereits einen starken Effekt der zellulären Mikroumgebung auf die Wirkung von Antitumorsubstanzen.

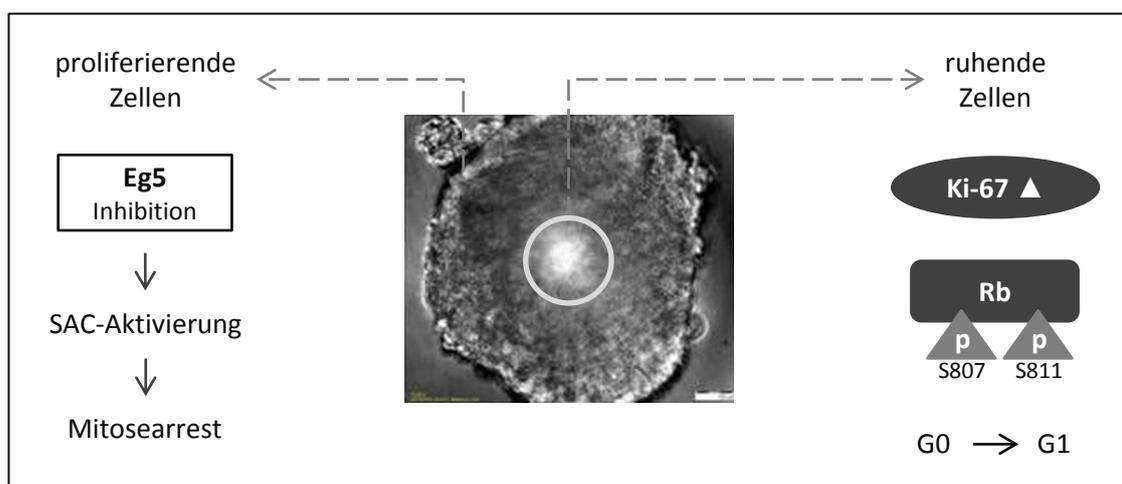


Abbildung 34: Modell für die Wirkung des Eg5-Inhibitors auf unterschiedliche Zelltypen im Sphäroid

Durch den Eg5-Inhibitor wurde einerseits ein Mitosearrest detektiert, der - für Kinesin-Inhibitoren typisch - durch Aktivierung des Spindel-Kontrollpunkts ausgelöst wird. Außerdem konnte neben einer verstärkten Translationsinitiation, ein erhöhtes Ki-67-Niveau sowie die Phosphorylierung von Rb an Serin 807 und Serin 811 detektiert werden. Diese Phosphorylierungen sind essentiell für die Transition ruhender Zellen aus G0 in den aktiven Zellzyklus. Da sich die Zellen im Sphäroid in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befinden, sind die gegenläufigen Effekte des Eg5-Inhibitors möglicherweise auf zwei Zellpopulationen zurückzuführen: Während in ruhenden Zellen des Sphäroidzentrums die G0-G1-Transition initiiert wird, werden proliferierende Zellen in der Peripherie am Spindel-Kontrollpunkt arretiert.

Abkürzungen: p – phospho

Das Sphäroidbild wurde freundlicherweise von Dr. Hella Kohlhof, 4SC AG, zur Verfügung gestellt.

Dass die gesamte Proteinsynthese während der Mitose im Vergleich zur Interphase um 25-30 % reduziert ist, wurde bereits gezeigt (Fan und Penman 1970, Bonneau und Sonenberg 1987). Um die Theorie zweier Zellpopulationen, welche unterschiedlich auf die Behandlung mit C5 reagieren, zu bestärken, soll im Folgenden das zeitliche Vorkommen verschiedener Proteinmodifikationen in Bezug auf den Zellzyklus diskutiert werden.

4E-BP1 liegt zu Beginn der Mitose nur schwach phosphoryliert vor, der

Phosphorylierungsgrad steigt aber im weiteren Verlauf an. Die Phosphorylierung durch CDK1 wird dabei als Auslöser für die Hyperphosphorylierung von 4E-BP1 gesehen (Van Der Kelen *et al.* 2009). Diese Hyperphosphorylierung im Verlauf der Mitose führt dazu, dass die Cap-abhängige Translation in G1 schnell wieder ansteigt und erst in der S-Phase durch eine erneute Assoziation von 4E-BP1 zu eIF4E wieder reduziert wird (Heesom *et al.* 2001, Pyronnet und Sonenberg 2001). In G0 kommt es zu einer inhibitorischen Bindung von 4E-BP1 an den Translationsinitiator eIF4E, wodurch die Cap-abhängige Translation verhindert wird (Brunn *et al.* 1997).

Die in dieser Arbeit beobachtete verstärkte Phosphorylierung von 4E-BP1 und eIF4E deutet somit darauf hin, dass sich die betroffenen Zellen in den Phasen G1 oder S, nicht jedoch in der Mitose befinden. Dies bestärkt die Vermutung, dass zwei Zellpopulationen existieren, die unterschiedlich auf C5 reagieren.

Auch das zeitliche Vorkommen der Phosphorylierung von mTOR, p38 MAPK und ERK1/2 in Bezug auf den Zellzyklus spricht dafür, dass die mit C5 detektierten Effekte zwei Zellpopulationen widerspiegeln: Eine Zellpopulation mit initiiertem Cap-abhängiger Translation, eine andere mit induzierter Mitose. In einer groß angelegten MS-basierten Analyse der mitotischen Phosphorylierung in Nocodazol-arretierten HeLa-Zellen wurde eine stark verringerte Phosphorylierung von ERK1/2, p38 MAPK und MEK2 detektiert (Dephoure *et al.* 2008). In Übereinstimmung dazu wurde in Nocodazol-synchronisierten CHO-Zellen eine Aktivierung von ERK1/2 während des gesamten Zellzyklus, mit Ausnahme der Metaphase, nachgewiesen. Sehr stark war die ERK1/2-Phosphorylierung vor allem in der G2-M- aber auch in der G1- und S-Phase (Tamemoto *et al.* 1992). Dies deutet auf eine essentielle Funktion von ERK1/2 in der G2-M-Transition hin, neben der bekannten Funktion in der G0-G1-Transition (Pagès *et al.* 1993, Brunet *et al.* 1994, Wright *et al.* 1999).

Es ist somit wahrscheinlich, dass die beobachtete erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 nicht durch mitotische Zellen, sondern durch eine Zellpopulation in der Interphase bedingt ist. Zu diesem Ergebnis kamen auch Deacon *et al.* (2003), die nach Behandlung mit Nocodazol zwei HeLa-Zellpopulationen vorfanden: Eine mitotische Population mit aktivierter p38 MAPK sowie eine nicht-mitotische Population mit phosphoryliertem ERK1/2 und JNK.

Die Behandlung von HT-29-Sphäroiden mit dem Eg5-Inhibitor C5 für 46 h zeigte weitreichende Effekte auf die Signalübertragung. Durch deren detaillierte Analyse konnten Wirkmechanismen von C5 aufgeklärt werden.

Die Aktivität mitotisch aktiver Kinasen wie Aurora A/B, PLK1, CDK1 sowie die stark erhöhte Phosphorylierung von Histon H3 an Serin 10, Threonin 11 und Serin 28 deuteten

auf einen durch C5 bedingten mitotischen Arrest der Zellen in der Metaphase hin. Diese Wirkung von Eg5-Inhibitoren ist in der Literatur bereits beschrieben und beruht auf einer Aktivierung des Spindel-Kontrollpunkts. Abhängig von Zellliniencharakteristika kommt es daraufhin zur Induktion der Apoptose. Wie in der Literatur beschrieben, reagieren HT-29-Zellen auf antimotische Substanzen mit Metaphasearrest. Das weitere Zellschicksal ist jedoch von der antimotischen Substanz, der Konzentration und der Behandlungsdauer abhängig, was die in dieser Arbeit nicht detektierte Induktion von Apoptosemarkern erklärt.

Die erhöhte Phosphorylierung von Rb sowie die Induktion von Ki-67 lassen vermuten, dass C5 auch ruhende Zellen beeinflusst, möglicherweise durch Induktion der G0-G1-Transition. Wahrscheinlich stammen die beobachteten Effekte von zwei Zellpopulationen, auf welche C5 in verschiedenen Phasen des Zellzyklus einwirkt: Im aktiven Zellzyklus befindliche Zellen werden in der Metaphase arretiert, während ruhende Zellen aus G0 in G1 und somit in den Zellzyklus überführt werden. Für eine Zellpopulation, welche parallel zu den mitotisch arretierten Zellen existiert, spricht auch die Aktivität von ERK1/2, welches laut Literatur in der Metaphase nicht aktiviert vorliegt. Außerdem konnte eine deutliche Induktion der Cap-abhängigen Translation beobachtet werden. Dies wurde aus der erhöhten Aktivität von ERK1/2, p38 MAPK, Akt und weiteren von diesen Kinasen abhängigen Proteinen sowie letztendlich aus der erhöhten Phosphorylierung von 4E-BP1 und eIF4E geschlossen. Da die Proteinsynthese in der Mitose stark reduziert ist und die Cap-abhängige Translation erst in G1 und S wieder zunimmt, deutet auch dies darauf hin, dass diese Effekte Zellen zuzuschreiben sind, die durch C5 die ruhende G0-Phase verlassen haben und sich nun in der Interphase befinden.

5.3 Analyse der Wirkung eines neuartigen Histon-Deacetylase-Inhibitors aus der Klasse der Hydroxamsäuren

Neben dem bereits diskutierten Eg5-Inhibitor wurden in dieser Arbeit zwei weitere proprietäre Medikamentenkandidaten der 4SC AG analysiert. Dabei handelt es sich um Substanzen aus der Klasse der Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi). Erste Vertreter dieser neuen Klasse von Antitumorsubstanzen, Vorinostat (Suberoylanilid Hydroxamsäure, SAHA) und Romidepsin, sind bereits für die Behandlung des kutanen T-Zelllymphoms zugelassen. HDACi bewirken durch Inhibition von Histon-Deacetylasen (HDAC) primär eine verstärkte Acetylierung von Histonschwänzen. Dadurch wird die Packungsdichte der DNA verringert, Gene werden für die Transkriptionsmaschinerie

zugänglich und Tumorsuppressoren werden verstärkt exprimiert. Neben den Histonen sind weitere Zielproteine von Histon-Deacetylasen bekannt. HDACi bewirken einen Zellzyklusarrest, Apoptoseinduktion sowie Zelldifferenzierung. Die grundlegenden Mechanismen der Anti-Tumor-Wirkung von HDACi sind bisher jedoch weitgehend ungeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Änderungen in der Signalübertragung nach Behandlung von Sphäroiden mit den proprietären HDACi C1 und C2 untersucht. Das Augenmerk lag dabei auf Effekten der beiden Substanzen auf die Kolontumorzelllinie HT-29. Zusätzliche Informationen über ihre Wirkung auf Stammzellcharakteristika wurden durch Analyse der Keimzelltumorzelllinie NCCIT gewonnen.

Die beiden HDACi zeichnen sich durch charakteristische Wirkprofile aus: C1 besitzt als Pan-HDACi aus der Klasse der Hydroxamsäuren, analog zu Trichostatin A und Vorinostat, eine breite Substratspezifität. C2 inhibiert hingegen hauptsächlich HDACs der Klasse I, da es sich, wie bei Entinostat, um ein Benzamid-Analogon handelt (persönliche Kommunikation 4SC AG).

Im Folgenden soll das Augenmerk auf die Analyse der mit C1 behandelten HT-29-Sphäroide gerichtet werden und die Wirkung von C1 mit beschriebenen Effekten von Vorinostat in Verbindung gebracht werden.

Die Analyse des Histon-Acetylierungsprofils nach Behandlung der HT-29-Sphäroide mit C1 zeigte eine stark erhöhte Acetylierung von Histon H3 an Lysin 9 sowie Histon H2B an Lysin 5. Mittels Peptidarrays zur Charakterisierung der Anti-Histon-Antikörper konnten Nebenreaktionen dieser Antikörper zu acetyliertem Histon H3 (K27) und Histon H4 (K20) nachgewiesen werden. Somit könnten auch diese Aminosäuren von der verstärkten Acetylierung betroffen sein. In der Literatur sind Effekte von Vorinostat auf die Acetylierung der Histone H2B, H3 und H4 in verschiedenen Zelltypen beschrieben. Die Kinetik der Acetylierung hängt dabei sowohl von den untersuchten Zellen als auch von den Behandlungskonzentrationen ab (Dedes *et al.* 2009, Hwang *et al.* 2009, LaBonte *et al.* 2009, Novotny-Diermayr *et al.* 2010, Liu und Xing 2012). Um ein detailliertes Acetylierungsprofil der Substanz C1 zu erstellen, sollten daher mehrere Behandlungszeitpunkte untersucht werden.

Durch Behandlung mit C1 konnte eine deutliche Induktion von Apoptosemarkern beobachtet werden. Die Menge an aktiver, gespaltener Caspase 3 war 5-fach erhöht und der Effekt der Caspaseaktivierung konnte flussabwärts zu PARP weiterverfolgt werden. Dieses Substrat von Caspase 3 wird durch Spaltung inaktiviert und somit an der Reparatur von DNA-Strangbrüchen gehindert (Nicholson *et al.* 1995, Tewari *et al.* 1995).

Zudem wurde eine Reduktion der Gesamtsignale von Caspase 3 und PARP detektiert, möglicherweise bedingt durch eine reduzierte Affinität der Antikörper an die gespaltenen Formen.

Apoptoseinitiation durch Caspase 3 kann einerseits über den extrinsischen Weg, durch Aktivierung der Caspasen 8 und 10, andererseits über den intrinsischen Weg und Caspase 9 erfolgen (Ola *et al.* 2011). In dieser Arbeit wurden insbesondere Proteine des intrinsischen Apoptosewegs untersucht: BAX wirkt proapoptotisch indem es Oligomere ausbildet, an Porenproteine der Mitochondrienmembran bindet und so zur Freisetzung von Zytocrom C führt (Jürgensmeier *et al.* 1998, Marzo *et al.* 1998). Bcl-X(L) bindet BAX und führt so zur Inhibition dessen proapoptotischer Wirkung (Ming *et al.* 2006). BAX konnte leicht erhöht detektiert werden, die Menge an antiapoptotischem Bcl-X(L) war reduziert. Die Änderungen im Expressionsgrad von BAX und Bcl-X(L) deuten auf eine Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs hin, eine Beteiligung des extrinsischen Apoptosewegs wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

In verschiedenen Arbeiten wurden bereits Effekte von Vorinostat auf den intrinsischen sowie den extrinsischen Apoptoseweg nachgewiesen: In thyroidalen Karzinomzelllinien waren unter anderem Bcl-X(L) herunterreguliert, BAX transient hochreguliert und die Caspasen 3, 7, 8 und 9 sowie PARP verstärkt gespalten detektiert worden (Mitsiades *et al.* 2005, Luong *et al.* 2006). In Kolonkarzinomzelllinien konnte durch Vorinostat ebenfalls eine verringerte Bcl-X(L)-Menge sowie die Spaltung von PARP detektiert werden (Sun *et al.* 2010). Hwang *et al.* (2009) detektierten die Spaltung der Caspasen 3, 8 und 9, wodurch sie eine Aktivierung des intrinsischen und des extrinsischen Signalwegs nachweisen konnten. In HT-29-Zellen konnten Portanova *et al.* (2008) durch Vorinostat ebenfalls eine verstärkte Spaltung der Caspasen 3, 8 und 9 zeigen.

Analog zu den in dieser Arbeit detektierten Effekten in HT-29-Sphäroiden, kam es nach Behandlung von Myelomzellen mit C1 (Resminostat) zur verstärkten Spaltung der Caspasen 3, 8 und 9 sowie zur Induktion von Bcl-X(L) (Mandl-Weber *et al.* 2010). Mandl-Weber *et al.* detektierten außerdem eine reduzierte Proliferationsrate, welche auf eine erhöhte Apoptoserate sowie einen reprimierten Zellzyklus zurückgeführt werden konnte. Dies zeigte sich unter anderem an den reduzierten Niveaus von Cyclin D1, Cdk4, p53 und Cdc25A sowie der verringerten Phosphorylierung von Rb und der Induktion von p21. Auch in dieser Arbeit konnte p21 erhöht detektiert werden, bei gleichzeitig reduzierter Phosphorylierung von Rb sowie einem reduzierten Cdc25A-Niveau.

Die HDACi-abhängige Induktion von p21 ist ein gut beschriebener Effekt und hat einen Zellzyklusarrest zur Folge (Richon *et al.* 2000). Glaser *et al.* (2003) postulierten die Induktion von p21 als abnormalen Kontrollpunkt, da den meisten Tumorzellen funktionsfähiges p53 oder Rb und somit ein funktioneller G1/S-Kontrollpunkt fehlt. Durch

Induktion von p21 kommt es in Tumorzellen zu Apoptose, wohingegen normale Zellen verschont bleiben (Glaser *et al.* 2003). Dies stellt eine Begründung für die selektive Wirkung von HDACi auf Tumorzellen dar.

Betrachtet man Aurora A, welche vor allem beim Kolonkarzinom häufig überexprimiert ist, so wird deutlich, dass deren Menge durch Behandlung der HT-29-Sphäroide mit C1 deutlich abnahm (Bischoff *et al.* 1998). Ihre relative Aktivität, definiert durch das Verhältnis der Phosphorylierung an Threonin 288 im Vergleich zur Gesamtmenge, nahm hingegen zu. Die phosphorylierte Form von Aurora A ist besonders anfällig für den Abbau über die Ubiquitin-Ligase APC (*anaphase promoting complex*), welche im Verlauf der Mitose zum proteasomalen Abbau der aktivierten Aurora A führt (Walter *et al.* 2000). Dies spiegelt sich in den Ergebnissen dieser Arbeit wider: Aurora A liegt stark phosphoryliert vor, wodurch der proteasomale Abbau verstärkt und die Gesamtmenge reduziert wird.

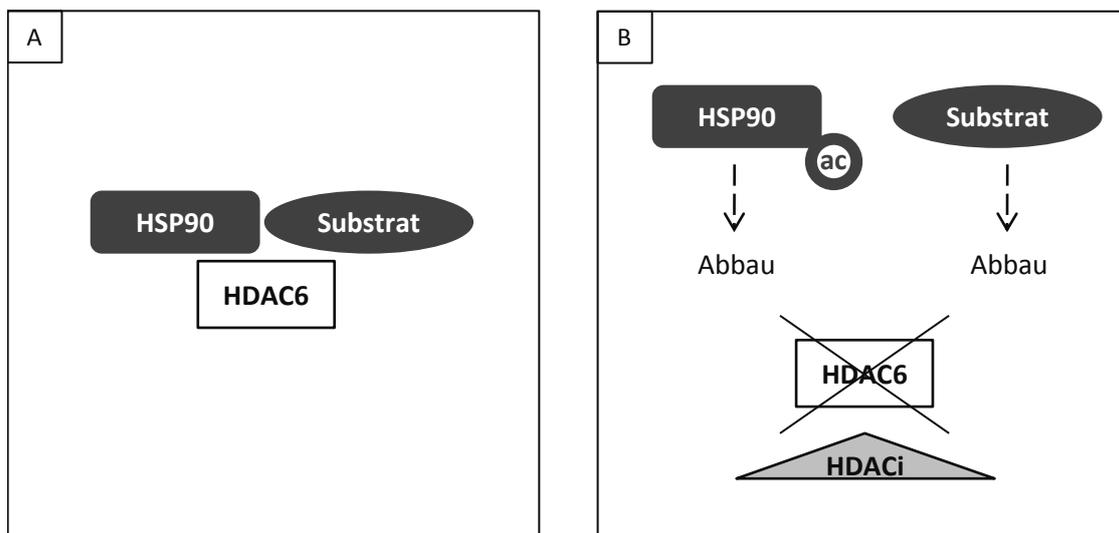


Abbildung 35: Modell der Inhibition von HSP90 durch Histon-Deacetylase-Inhibitoren

A) HSP90 liegt in der Zelle im Komplex mit seinen Substraten und HDAC6 vor. B) Durch Behandlung der Zellen mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) kommt es zur Inhibition von HDAC6, wodurch HSP90 nicht mehr deacetyliert wird. Die verstärkte Acetylierung von HSP90 führt zur Auflösung des Komplexes und HSP90 sowie seine Substrate werden abgebaut.

Abkürzungen: ac – acetyl

Cha *et al.* (2009) zeigten in verschiedenen Nierenzelllinien ein reduziertes Aurora A-Niveau nach Hydroxamsäure-Behandlung. In der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 wurde eine Reduktion von Aurora A nach 24-stündiger Hydroxamsäure-Behandlung beschrieben, wohingegen Aurora B unverändert blieb (Park *et al.* 2008). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte durch C1 eine reduzierte Menge Aurora A, hingegen eine nur minimal verringerte Menge Aurora B detektiert werden. Park *et al.* (2008) begründeten das reduzierte Aurora A-Niveau mit einer HDACi-bedingten

Inhibition von HSP90. HSP90 liegt normalerweise im Komplex mit seinen Substraten, beispielsweise Aurora A, und HDAC6 vor. Durch die Inhibition von HDAC6 und der damit einhergehenden verstärkten Acetylierung von HSP90 löst sich dieser Komplex auf und HSP90 sowie seine Substrate werden abgebaut (Park *et al.*, 2008; Abbildung 35). Neben Aurora A sind hiervon unter anderem Akt, Her2, mutiertes p53 und c-Raf betroffen (Khan und La Thangue 2012, Mollapour und Neckers 2012). Akt, Her2 und c-Raf waren durch Behandlung der HT-29-Sphäroide mit C1 leicht reprimiert, p53 wurde nicht gemessen. In einem von Li *et al.* (2011) beschriebenen Modell der Wirkungsweise von Vorinostat steht mutiertes p53 im Mittelpunkt: p53, welches in den meisten Kolontumorzellen in einer mutierten, hyperstabilen Form vorliegt, bindet HSP90, wodurch sein Abbau verhindert wird. Die Vorinostat-bedingte Inhibition von HDAC6 hat die Acetylierung von HSP90 zur Folge, wodurch die Bindung zu mutiertem p53 gelöst wird. p53 kann nun durch die E3-Ligasen MDM2 und CHIP abgebaut werden, was die Tumorzellen für Chemotherapeutika sensibilisiert (Li *et al.* 2011).

Weitere Substrate von HSP90 sind in der Zellzyklusregulation zu finden. Dabei handelt es sich um die Phosphatasen Cdc25A, Cdc25C, die Kinase Wee1 sowie deren Substrat CDK1 (García-Morales *et al.* 2007, Madlener *et al.* 2009, Tse *et al.* 2009). Durch die HDACi-bedingte Inaktivierung von HSP90 sollten sie verstärkt abgebaut werden. Reduzierte Niveaus von Cdc25A, Cdc25C und CDK1 konnten nach Behandlung mit C1 detektiert werden. Auch der Phosphorylierungsgrad von Cdc25A (S75), welcher stressabhängig durch p38 MAPK induziert wird und die Degradation unterstützt, war analog zur Aktivität von p38 MAPK reduziert (Goloudina *et al.* 2003).

Betrachtet man die an der Zellzyklusregulation beteiligten HSP90-Substrate, so wird deutlich, dass durch die reduzierten Niveaus von Wee1 und Cdc25C die Phosphorylierung an CDK1 stark beeinträchtigt ist. Sowohl die verantwortliche Kinase als auch die verantwortliche Phosphatase lagen reprimiert vor, was eine verringerte inhibierende Phosphorylierung von CDK1 (Y15) zur Folge haben sollte. Da aber auch die Gesamtmenge an CDK1 reduziert war, reichte die erhöhte Aktivität von CDK1 wohl nicht aus, um durch Bindung von phosphoryliertem Cyclin B1 den MPF (*mitosis promoting factor*, Mitose promovierender Faktor) auszubilden und Mitose zu induzieren (Strebhardt 2010). Des Weiteren bedingt CDK1 die inhibierende Phosphorylierung der Phosphatase PP1 α (Kwon *et al.* 1997). Diese war im Verhältnis zum Gesamtprotein reprimiert, PP1 α lag somit in einer aktiven Form vor. Die Aktivierung von PP1 α konnte auch durch die verstärkte Dephosphorylierung von Histon H3 an Serin 10 und Serin 28 bestätigt werden (Goto *et al.* 2002). Mit Rb und Cdc25 lagen weitere Substrate von PP1 α verringert phosphoryliert vor (Izumi *et al.* 1992, Rubin *et al.* 2001). Auch flussaufwärts von Cdc25 zeigte sich bei PLK1 und den Aurorakinasen A/B/C eine Aktivitätsabnahme nach

46-stündiger Behandlung mit C1. Insgesamt wurden mitotische Signale durch C1 somit reduziert.

Um durch C1-Behandlung ausgelösten zellulären Stress zu analysieren, wurden Chaperone und weitere Marker untersucht. Die Chaperone HSP90 und Calretikulin waren nach Behandlung mit C1 reduziert, ebenso die Phosphorylierung von eIF2 α , welche stressabhängig über PERK induziert wird (Harding *et al.* 1999). CHOP, welches induziert durch zellulären Stress einen G1/S-Arrest auslöst, war in dieser Arbeit reduziert (Barone *et al.* 1994). Lediglich der membranständige Stresssensor IRE1 α zeigte eine starke Erhöhung. Durch mRNA-Splicing führt IRE1 α zur Bildung des Transkriptionsfaktors Hac1, welcher die Expression von Chaperonen und anderen ER-Stress-Proteinen fördert (Tirasophon *et al.* 2000). Die erhöhte Menge von IRE1 α war jedoch der einzige Indikator für zellulären Stress in den für 46 h behandelten Sphäroiden. Wahrscheinlich kommt es bereits vor dem analysierten Zeitpunkt zu Stressinduktion in den Zellen. So hat, wie bereits beschrieben, die Inhibition von HDAC6 und die damit einhergehende Acetylierung von HSP90 den Anstieg ungefalteter Proteine im ER zur Folge. Möglicherweise sind nach 46 h lediglich die Nachwirkungen dieser Stress-Situation sichtbar, beispielsweise an den reduzierten Niveaus von HSP90 und seinen Substraten. Hierauf deuten auch die Arbeiten von Portanova *et al.* (2008) hin, sie konnten in HT-29-Zellen nach 16-stündiger Behandlung mit Vorinostat ein maximales Level reaktiver Sauerstoffspezies zeigen. Außerdem waren zwischen 16 h und 24 h die stressinduzierten Proteine p38 MAPK und JNK verstärkt phosphoryliert.

Effekte von Vorinostat auf MAPK-Signalwege sind in verschiedenen Zelllinien beschrieben, jedoch stark von den untersuchten Zellen und der Behandlungsdauer abhängig. In verschiedenen Arbeiten konnte eine reduzierte Phosphorylierung von ERK1/2 detektiert werden, die Phosphorylierung von JNK und p38 MAPK war nach 24 h eher erhöht. In HT-29-Zellen zeigten Portanova *et al.* (2008) nach 24 h eine verstärkte Phosphorylierung von p38 MAPK und JNK. Dies wurde auch auf lymphoplasmatischen Tumorzellen detektiert, parallel zu einer abrupten Dephosphorylierung von ERK1/2 (Sun *et al.* 2011). Humane Bcr/Abl+-Zellen zeigten nach 24 h ebenfalls eine verringerte Phosphorylierung von ERK1/2 und MEK1/2 (Yu *et al.* 2003). In humanen Lymphomzellen wurde nach 48 h eine verringerte Phosphorylierung von ERK1/2 und MEK detektiert. p38 MAPK zeigte bei 24 h eine erhöhte Phosphorylierung mit Reduktion bei 48 h und sowohl Phosphorylierung als auch Expression von JNK waren erhöht (Zhang *et al.* 2009). Ein erhöhter Expressionsgrad von JNK konnte auch nach Behandlung der HT-29-Sphäroide mit C1 detektiert werden, wohingegen die Aktivität der MAPK-Signalwege insgesamt verringert war. Der Phosphorylierungsgrad von ERK1/2,

p38 MAPK und JNK war stark reduziert und auch flussaufwärts von ERK1/2 zeigten MEK1/2 und c-Raf (S259) eine verringerte Phosphorylierung. Zwar ist die Aktivierung von c-Raf sehr komplex, die Dephosphorylierung von Serin 259 stellt aber einen essentiellen Faktor dar (Chong *et al.* 2001, Kubicek *et al.* 2002, Niault und Baccarini 2010). Ebenfalls war die konstitutiv aktivierende Phosphorylierung von b-Raf (S445) verringert, wobei auch hier verschiedene Mechanismen die Aktivität beeinflussen (Papin *et al.* 1998, Mason *et al.* 1999).

Flussabwärts von ERK1/2 zeigten RSK1, MSK1 und Mnk1 allesamt eine reduzierte Phosphorylierung und auch der Translationsinitiator eIF4E und sein inhibitorisches Bindeprotein 4E-BP1 lagen verringert phosphoryliert vor. Die reduzierte Mnk1-abhängige Phosphorylierung von eIF4E deutet, ebenso wie die reduzierte Phosphorylierung von 4E-BP1, auf eine inhibierte Cap-abhängige Translation hin (Brunn *et al.* 1997, Pyronnet *et al.* 1999, Waskiewicz *et al.* 1999, Magnuson *et al.* 2012).

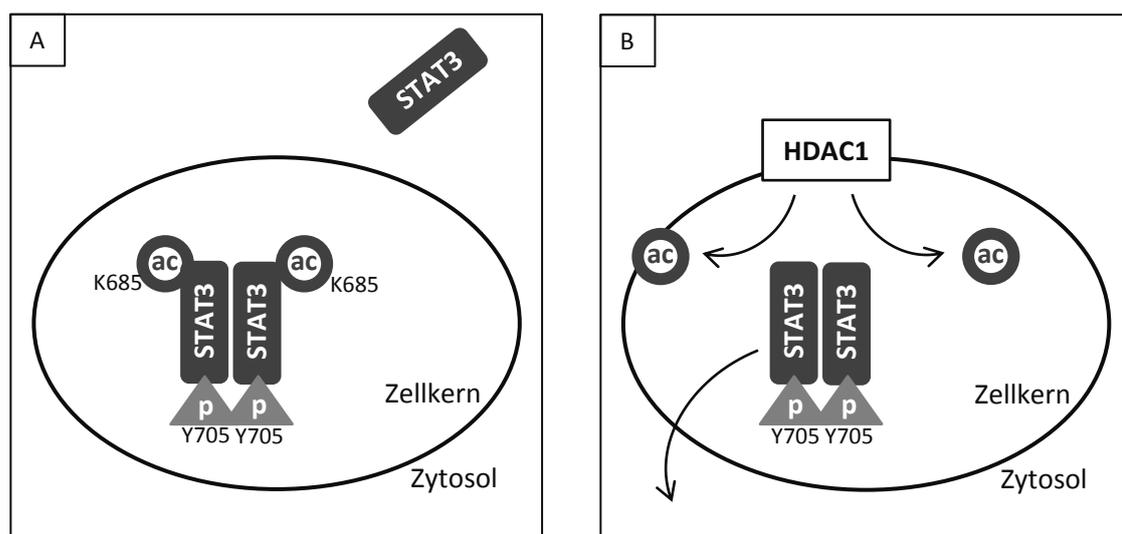


Abbildung 36: Regulation der zellulären Lokalisation von STAT3

A) Unmodifiziertes STAT3 befindet sich im Zytoplasma, wo es durch Phosphorylierung an Tyrosin 705 aktiviert wird. Dies hat die Dimerisierung und nukleäre Translokation von STAT3 zur Folge. Durch Acetylierung von Lysin 685 wird die nukleäre Lokalisation erhöht, was zur Transkriptionsaktivierung führt. B) HDAC1 bewirkt die Deacetylierung von STAT3, woraufhin dessen nukleäre Lokalisation reduziert wird. Histon-Deacetylase-Inhibitoren wirken dem entgegen und STAT3 bleibt in acetylierter Form im Zellkern lokalisiert. Abkürzungen: p – phospho, ac – acetyl

Auffällig ist die 3-fach erhöhte Menge an STAT3 nach Behandlung der HT-29-Sphäroide mit C1. STAT3 wird als Transkriptionsfaktor durch Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert und hat proliferative und antiapoptotische Wirkung. Durch Phosphorylierung wird STAT3 aktiviert, dimerisiert und transloziert in den Zellkern (Germain und Frank 2007, Johnston und Grandis 2011). Acetylierung von Lysin 685 durch p300 erhöht die nukleäre Lokalisation, die DNA-Bindung und damit die transkriptionelle Aktivität von STAT3. Die

Deacetylierung von STAT3 wird durch Inhibition von HDAC1 verhindert, wodurch STAT3 weiter im Zellkern gehalten wird (Wang et al., 2005; Ray et al., 2008; Abbildung 36). Die erhöhte Menge an STAT3 nach Behandlung mit C1 könnte somit mit dessen Acetylierungsstatus zusammenhängen.

In der Literatur sind Wechselwirkungen zwischen STAT3 und anderen Proteinen beschrieben, welche meist über p300 vermittelt sind. So kommt es durch phosphoryliertes STAT3 zur Rekrutierung von p300 an RelA. RelA wird daraufhin acetyliert, was den Export von NF- κ B aus dem Zellkern inhibiert und die Aktivität von NF- κ B verstärkt (Lee et al. 2009a). Außerdem bindet internalisiertes CD44 an STAT3 und p300, was die Acetylierung von STAT3 und Expression von Cyclin D1 zur Folge hat (Lee et al. 2009b). Acetyliertes STAT3 führt außerdem durch Wechselwirkungen mit der DNA-Methyltransferase 1 zur verstärkten Methylierung der CpG-Inseln in Tumorsuppressorgenen (Lee et al. 2012). Des Weiteren bindet durch p300 acetyliertes und dimerisiertes Survivin an STAT3-Dimere, wodurch die Transkriptionsaktivierung durch STAT3 verhindert wird (Wang et al. 2010). Auch in acetylierter Form zeigt STAT3 somit proliferative und antiapoptotische Effekte. Weder die Expression oder Aktivierung von NF- κ B, noch die von Cyclin D1 wurde in dieser Arbeit durch C1 beeinflusst. Bei CD44 wurde eine stark verringerte Expression detektiert.

In Patienten mit T-Zelllymphom (CTCL) wurde gezeigt, dass sich durch Behandlung mit Vorinostat die Lokalisation von phosphoryliertem STAT3 aus dem Zellkern ins Zytosol verlagert (Duvic et al. 2007). Es wurde jedoch keine veränderte Expression, Phosphorylierung oder Acetylierung von STAT3 nach Behandlung mit Vorinostat detektiert (Fantin et al. 2008, Tiffon et al. 2011). Vorinostat beeinflusst somit zwar die Lokalisation von STAT3, der mit C1 detektierte Effekt der Induktion von STAT3 scheint aber für C1 spezifisch zu sein. Ob der gemessene Effekt mit einer erhöhten Acetylierung und nukleären Lokalisation von STAT3 einhergeht, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Möglicherweise könnte eine Kombination von C1 mit JAK-Inhibitoren zu synergistischen Effekten führen, wie schon bei Patienten mit konstitutiv aktivem STAT-Signalweg durch Kombination von Vorinostat mit JAK-Inhibitoren gezeigt wurde (Fantin et al. 2008).

Durch Behandlung der HT-29-Sphäroide mit der Hydroxamsäure C1 konnten Effekte detektiert werden, die in der Literatur bereits für die Hydroxamsäure Vorinostat beschrieben sind.

Insgesamt wurde eine stark erhöhte Apoptoserate detektiert, sichtbar an der verstärkten Spaltung von Caspase 3 und PARP sowie an der Expression von BAX und Bcl-X(L). Eine verstärkte Acetylierung von Histonen wurde vor allem an Lysin 9 und Lysin 14 von Histon H3 sowie an Lysin 5 von Histon H2B sichtbar. Die Phosphorylierung von Histon H3

war reduziert, ebenso die Aktivität der verantwortlichen Kinase Aurora B; die Aktivität der verantwortlichen Phosphatase PP1 α war erhöht. Eine reduzierte Aktivierung des Zellzyklus zeigte sich vor allem an der Phosphorylierung von Rb, welche durch Behandlung mit C1 fast komplett verschwand.

Viele Substrate von HSP90, beispielsweise Aurora A, CDK1 und Cdc25 wurden in ihrer Expression reprimiert. In der Literatur ist die Wirkung von Hydroxamsäuren auf HSP90 ausführlich beschrieben, sie resultiert aus einer Hemmung von HDAC6, wodurch es zur Inhibition von HSP90 kommt, weshalb Substrate nicht mehr von HSP90 gebunden und dadurch abgebaut werden.

Auf MAPK-Signalwege konnte ein inhibitorischer Einfluss von C1 detektiert werden, was sich unter anderem am verringerten Phosphorylierungsgrad von ERK1/2, p38 MAPK und JNK zeigte. Flussaufwärts von ERK1/2 wurde eine Hemmung von MEK1 und c-Raf gemessen, welche flussabwärts zu RSK1, MSK1, Mnk1 und eIF4E nachverfolgt werden konnte. Dies lässt auf eine Inhibition des ERK1/2-Signalwegs durch C1 schließen und deutet auf eine verringerte Translationsinitiation hin. Inhibitorische Effekte auf ERK1/2 sind mit Vorinostat in der Literatur bereits beschrieben.

Die starke Induktion des Transkriptionsfaktors STAT3 durch C1, hebt sich von den mit Vorinostat beschriebenen Effekten ab. Möglicherweise könnte die Hemmung von HDAC1, welche eine erhöhte Acetylierung und nukleäre Lokalisation von STAT3 zur Folge hat, die Gesamtmenge an STAT3 beeinflussen. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob zur Therapie möglicherweise eine Kombination von C1 mit JAK-Inhibitoren vorteilhaft wäre.

Somit konnten viele für Vorinostat bereits beschriebene Effekte bei C1 wiedergefunden werden. Zusätzlich wurde eine starke Induktion von STAT3 detektiert, was eine C1-spezifische Wirkung darstellt.

5.3.1 Wirkung der Histon-Deacetylase-Inhibitoren auf

Stammzellcharakteristika

Durch Analyse der Wirkung von HDACi auf die Keimzelltumorzelle NCCIT sollen Informationen über ihre Effekte auf Stammzellcharakteristika gewonnen werden. Hierfür wurden NCCIT-Sphäroide über 48 h mit zwei HDACi behandelt, wobei nach 30 min, 2 h, 6 h und 24 h Proben genommen wurden, um den zeitlichen Verlauf zu visualisieren.

Als Vertreter der Pan-HDACi, welche wie Vorinostat ein breites Wirkspektrum besitzen, wurde die Hydroxamsäure C1 analysiert. Mit C2 wurde ein Benzamid-Analogon untersucht welches hauptsächlich HDACs der Klasse I inhibiert und somit Entinostat ähnelt (persönliche Kommunikation 4SC AG).

Insgesamt wurden in NCCIT-Sphäroiden weniger Effekte detektiert als in HT-29-Sphäroiden, was möglicherweise an der technisch bedingt geringeren Proteinmenge lag welche auf die Mikroarray-Chips aufgebracht worden war. Infolge dessen wurden nur sehr starke Effekte sichtbar und kleinere Änderungen gingen im Hintergrundrauschen unter. Außerdem waren die Behandlungskonzentrationen für die HT-29-Sphäroide zehnfach höher gewählt als für die NCCIT-Sphäroide. Da es sich bei HT-29 und NCCIT um komplett unterschiedliche Zellarten handelt, waren Unterschiede in den Effekten durchaus erwartet.

Für die Phosphorylierung von Histon H3 an Threonin 11 konnte bei den mit C1 behandelten HT-29-Sphäroiden eine Reduktion detektiert werden, die auch bei den NCCIT-Sphäroiden nach 48 h sichtbar wurde. Sehr interessant war in diesem Fall der zeitliche Verlauf, da es ab 6 h Behandlungsdauer zu einer starken Hochregulation kam, welche anschließend wieder abfiel.

C2 hatte ab 24 h eine leicht erhöhte Acetylierung von Histon H3 (K9) zur Folge. Durch C1 kam es bereits ab 30 min zu einer erhöhten Acetylierung, welche nach 6 h weiter anstieg. Die Monomethylierung an Histon H3 (K4) zeigte durch C1 einen ähnlichen Verlauf.

Durch die zeitaufgelöste Analyse wurde die Aktivierung von Caspasen und PARP in den NCCIT-Sphäroiden durch beide HDACi gut sichtbar. Beginnend nach 6 h nahm deren Aktivität konstant zu.

Die Phosphorylierung von Akt zeigte durch Behandlung mit C2 einen interessanten zeitlichen Verlauf: Die Aktivität stieg bis 6 h stetig an und fiel anschließend wieder ab. Analog dazu wurde die Phosphorylierung von GSK3 β nach 24 h reduziert.

Durch C1 konnten inhibitorische Effekte auf den mTOR-Signalweg detektiert werden, welcher z.B. über 4E-BP1, p70-S6K und das ribosomale Protein S6 translationsinitiierende Funktionen hat (Brunn *et al.* 1997, Pende *et al.* 2004, Meyuhas 2008, Magnuson *et al.* 2012). Sowohl die Phosphorylierung von Akt als auch die seiner Substrate mTOR, GSK3 β und MDM2 nahm ab 6 h ab. Der Phosphorylierungsstatus von 4E-BP1, p70-S6K und dem ribosomalen Protein S6 blieb hingegen unverändert.

In hepatozellulären Karzinomzellen und Mäusefibroblasten wurde durch Herunterregulation des mTOR-Signalwegs Autophagie induziert, was an der verringerten Phosphorylierung von mTOR, Akt, p70 S6K und 4E-BP1 gezeigt wurde (Liu *et al.* 2010, Gammoh *et al.* 2012). Auch Shao *et al.* (2004) beschrieben Autophagie als Reaktion auf Vorinostat.

Eine Beeinflussung des Zellzyklus durch C1 und C2 konnte an der verringerten Phosphorylierung von Rb detektiert werden. Des Weiteren wurde durch Behandlung mit

C2 eine erhöhte Phosphorylierung von Aurora A/B/C, PLK1 und Histon H3 detektiert. Dies deutet auf einen Metaphasearrest der Zellen hin (Hsu *et al.* 2000, Giet und Glover 2001, McManus und Hendzel 2006, Macůrek *et al.* 2008).

Durch Behandlung der NCCIT-Sphäroide mit C2 wurde ab 6 h eine verstärkte Phosphorylierung von c-Jun (S63 und S73) detektiert, JNK lag jedoch unverändert vor. Portanova *et al.* (2008) zeigten nach Behandlung von HT-29-Zellen mit Vorinostat ebenfalls eine erhöhte Phosphorylierung von c-Jun, einhergehend mit einer erhöhten Aktivität der verantwortlichen Kinase JNK (Dérillard *et al.* 1994). In Leukämiezellen konnte gezeigt werden, dass die Kombination von Entinostat mit einem NF- κ B-Inhibitor, unter anderem durch JNK-Aktivierung, die apoptotische Wirkung verstärkt (Dai *et al.* 2005).

Um Effekte der HDACi auf den Stammzellcharakter von NCCIT-Sphäroiden zu untersuchen, wurden verschiedene Stammzellmarker analysiert. Während Nanog, Oct-4 und SOX-9 durch die Behandlung kaum moduliert wurden, zeigte SOX-2 Veränderungen. Durch C1 kam es bereits nach 2 h zu einer deutlichen Abnahme der SOX-2-Expression, C2 zeigte weniger starke Effekte mit einer minimalen Expressionsminderung ab 24h. In der Literatur ist die Reduktion von SOX-2 nach Behandlung von NCCIT-Zellen mit verschiedenen HDACi beschrieben, einhergehend mit einer Reduktion von Nanog und Oct-4 (Venkataramani *et al.* 2012). Außerdem wurde gezeigt, dass es durch den HDACi Apicidin zu deaktivierenden epigenetischen Veränderungen im Nanog-Promotor kommt. Unter anderem wurde eine verstärkte Trimethylierung von Histon H3 an Lysin 27, eine Demethylierung von Lysin 4 sowie eine Hyperacetylierung von Histon H3 und H4 detektiert. Dies führte zur Reduktion von Nanog und damit einhergehend zur Reduktion von Oct-4 und SOX-2 (You *et al.* 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Western Blot in NCCIT-Sphäroiden nach Behandlung mit C1 ebenfalls eine erhöhte Trimethylierung von Histon H3 an Lysin 27 beobachtet werden.

In NCCIT-Sphäroiden wurde durch Behandlung mit C1 und C2 eine erhöhte Apoptoserate detektiert. Die verringerte Phosphorylierung von Akt, mTOR, GSK3 β und MDM2 deutet auf eine Inhibition des mTOR-Signalwegs hin, was einen Hinweis auf induzierte Autophagie gibt. Für C2 konnte neben einer Aktivierung der mitotischen Kinasen Aurora A/B/C und PLK1 eine deutlich erhöhte Phosphorylierung von c-Jun detektiert werden. Des Weiteren wurde der Stammzellmarker SOX-2 durch Behandlung mit C1 und C2 reduziert, was in der Literatur mit einer erhöhten Trimethylierung von Histon H3 an Lysin 27 in Verbindung gesetzt wird, welche für C1 im Western Blot gezeigt werden konnte.

5.4 Analyse der Wirkung eines neuartigen Histon-Deacetylase-Inhibitors aus der Klasse der Benzamide

Neben der Hydroxamsäure C1, welche eine breite Substratspezifität zeigt, wurde in dieser Arbeit ein weiterer proprietärer HDACi der 4SC AG analysiert. Dabei handelt es sich um einen Vertreter der Benzamide, einer Gruppe von HDACi, die hauptsächlich HDACs der Klasse I inhibieren. C2 fällt somit in dieselbe Substanzklasse wie Entinostat und inhibiert spezifisch HDAC1, 2 und 3 (persönliche Kommunikation 4SC AG).

Im Folgenden sollen die auf Sphäroiden der Kolontumorzelllinie HT-29 detektierten Effekte von C2 mit denen von C1 in Verbindung gebracht werden. Wie stark sich die beiden HDACi unterscheiden wird hierbei deutlich. Besonders interessant erscheint die Tatsache, dass die Effekte von C2 stark von der Behandlungskonzentration abhängen. Während HT-29-Sphäroide nach Behandlung mit C2 in hoher Konzentration ähnliche Effekte zeigten wie nach Behandlung mit C1, ähnelten die Effekte nach Behandlung mit C2 in geringer Konzentration denen des Eg5-Inhibitors C5. Um dieser Beobachtung gerecht zu werden, werden im Folgenden erst die HDACi-typischen Effekte von C2 betrachtet, welche durch Behandlung der Sphäroide in hoher Dosierung entstehen, anschließend werden die Eg5-Inhibitor-ähnlichen Effekte durch Behandlung in geringer Dosierung näher betrachtet.

In der Literatur sind ähnliche Genexpressionsmuster verschiedener HDACi nach Behandlung von Mamma- und Blasenkarzinomzellen beschrieben, trotzdem wurden Unterschiede in der Genexpression durch Entinostat im Vergleich zu den Hydroxamsäuren Trichostatin A und Vorinostat detektiert. Nur 13 von 6800 untersuchten Genen mit Beteiligung bei Zellzyklusregulation, DNA-Synthese und Apoptose wurden durch die drei HDACi gleich moduliert (Glaser *et al.* 2003). Diese Ergebnisse basieren auf mRNA-Expressionsstudien, wohingegen in der vorliegenden Arbeit neben der Proteinexpression vor allem Modifikationsmuster und Proteinaktivitäten untersucht wurden. Obwohl es sich um zwei unterschiedliche Klassen von HDACi handelt, zeigte C2 in hoher Dosierung für die untersuchten Proteine und Proteinmodifikationen insgesamt sehr ähnliche Effekte wie C1, wenn auch in unterschiedlich starker Ausprägung. Lediglich die Acetylierung von Histon H2B (K 5) und die Menge an IRE1 α wurden durch C2 nicht analog zu C1 erhöht.

Bei der Diskussion der Wirkmechanismen von C1 wurden viele Effekte der Inhibition von HDAC6 zugeschrieben, diese wird jedoch durch das Benzamid-Analogon C2 nicht inhibiert (unveröffentlichte Ergebnisse der 4SC AG). Als zytosolisches Enzym deacetyliert

HDAC6 vor allem Nicht-Histonproteine wie α -Tubulin und HSP90 (Verdel *et al.* 2000, Hubbert *et al.* 2002, Haggarty *et al.* 2003). Außerdem ist HDAC6 als Mikrotubuli-assoziierte Deacetylase und Komponente des Aggresoms für den Abbau fehlgefalteter Proteine mitverantwortlich (Kawaguchi *et al.* 2003). Die verstärkte Acetylierung von HSP90 durch Inhibition von HDAC6 führt zur Deaktivierung von HSP90 und dadurch zum proteasomalen Abbau von HSP90-Substraten (Bali *et al.* 2005). Nishioka *et al.* (2008) zeigten jedoch, dass der Klasse I-spezifische HDACi Entinostat in Leukämiezellen ebenfalls zur Acetylierung von HSP90 führt. Des Weiteren wurde in Mammakarzinomzellen gezeigt, dass durch Inhibition von HDAC1 nukleäres HSP90 acetyliert wird (Zhou *et al.* 2008b). Somit trägt neben HDAC6 unter anderem auch HDAC1 zur Acetylierung von HSP90 bei. Da HDAC6 durch C2 nicht inhibiert wird, bleibt HSP90 wahrscheinlich durch Inhibition von HDAC1 acetyliert, was die Repression von Aurora A, Cdc25A, Cdc25C und CDK1 zur Folge hat. Ob bei Behandlung der Zellen mit C1 diese Inhibition über HDAC1 oder HDAC6 abläuft, bleibt zu klären, möglicherweise sind auch beide HDACs involviert.

Betrachtet man die Effekte von C2 in geringer Dosierung, so wird deutlich, dass die erzielten Effekte denen des Eg5-Inhibitors C5 stark ähneln. Für C5 wurde unter anderem ein Arrest der Zellen in der Metaphase gezeigt, welcher durch Aktivierung des Spindel-Kontrollpunkts SAC erfolgt und als klassischer Wirkmechanismus für Kinesin-Inhibitoren gilt. Durch Behandlung der Sphäroide mit C2 in geringer Dosierung wurden für viele Proteine dieselben Tendenzen gezeigt, wenn auch meist schwächer ausgeprägt als mit C5. C2 scheint somit neben seiner HDACi-Aktivität - oder eben gerade durch diese - die Mitose zu beeinflussen. Während bei hohen Behandlungskonzentrationen die HDACi-Komponente bestimmend ist, gewinnt die antimitotische Komponente bei geringen Behandlungskonzentrationen an Wirkung. Eine Beeinflussung des Spindel-Kontrollpunkts durch Acetylierung von Proteinen ist in der Literatur bereits beschrieben und könnte einen Zusammenhang zwischen C2 und C5 darstellen (Ishii *et al.* 2008, Choi *et al.* 2009, 2012, Xia *et al.* 2012).

Dass C2 auch bei niedrigen Behandlungskonzentrationen HDACi-Aktivität besitzt, zeigte sich an der erhöhten Acetylierung von Histon H3 (K9 und K14). Des Weiteren konnte eine Aktivierung von Caspase 3 detektiert werden, welche durch C5 nicht ausgelöst wurde. Proteine, deren Aktivitäten durch C1 reprimiert, durch C5 jedoch aktiviert wurden, blieben durch Behandlung mit C2 in geringer Dosierung unverändert. Hiervon betroffen war der Phosphorylierungsgrad von Akt, ERK1/2, Histon H3, 4E-BP1 und Rb.

Durch Behandlung der HT-29-Sphäroide mit C2 in geringer Dosierung konnten Effekte auf den Zellzyklus detektiert werden, welche einen Mitosearrest der Zellen zur Folge haben und für Kinesin-Inhibitoren beschrieben sind. C5-spezifische Effekte, welche für klassische Kinesin-Inhibitoren nicht bekannt sind, wurden hingegen nicht detektiert. So kam es weder zu einer erhöhten Ki-67-Expression oder Phosphorylierung von Rb, noch wurden Hinweise auf eine erhöhte Translationsinitiation gefunden.

Dass eine Kombinationsbehandlung von Antimitotika mit HDACi vorteilhaft sein kann, wurde schon mehrfach gezeigt und macht die Kombination dieser Effekte in einer Substanz besonders interessant. In Mammakarzinomzellen konnten synergistische Effekte von Vorinostat mit Docetaxel detektiert werden (Bali *et al.* 2005). Synergistische Effekte der Kombination von Vorinostat mit Paclitaxel wurden in NSCLC-Patienten gezeigt (Ramalingam *et al.* 2010). Diese Synergien wurden der erhöhten Stabilität von α -Tubulin durch HDAC6-abhängige Acetylierung zugeschrieben (Owonikoko *et al.* 2010). In NSCLC-Zelllinien wurden durch Kombination von Entinostat mit Paclitaxel oder dem HSP90-Inhibitor 17-AAG synergistische Effekte auf die Inhibition des Zellwachstums sichtbar (Wang *et al.* 2000, Kakahana *et al.* 2009). Da HDAC6 durch Entinostat nicht inhibiert wird, müssen hier andere synergetische Mechanismen beteiligt sein (Khan *et al.* 2008, Rao *et al.* 2008, Kakahana *et al.* 2009). Nguyen *et al.* stellen einen Zusammenhang über NF- κ B her, dieser proliferative Signalweg wird durch Entinostat aktiviert, durch 17-AAG jedoch inhibiert. Entinostat führt über Inhibition von HDAC3 und HDAC1 zur Acetylierung von RelA und STAT3, woraufhin der Komplex aus acetyliertem RelA, acetyliertem STAT3 und p300 schließlich NF- κ B bindet, welches daraufhin aktiv im Zellkern gehalten wird (Lee *et al.* 2009a, Nguyen *et al.* 2009). HSP90 ist hingegen für die Aktivierung des I κ B-Kinase-Holokomplexes (IKK) verantwortlich. Inhibition von HSP90 verhindert diese Aktivierung und NF- κ B bleibt inaktiv an I κ B gebunden im Zytosol (Karin 2006, Hinz *et al.* 2007). Die Kombination von Entinostat mit 17-AAG hat somit die Inhibition von NF- κ B mit seinen proliferativen Eigenschaften zur Folge.

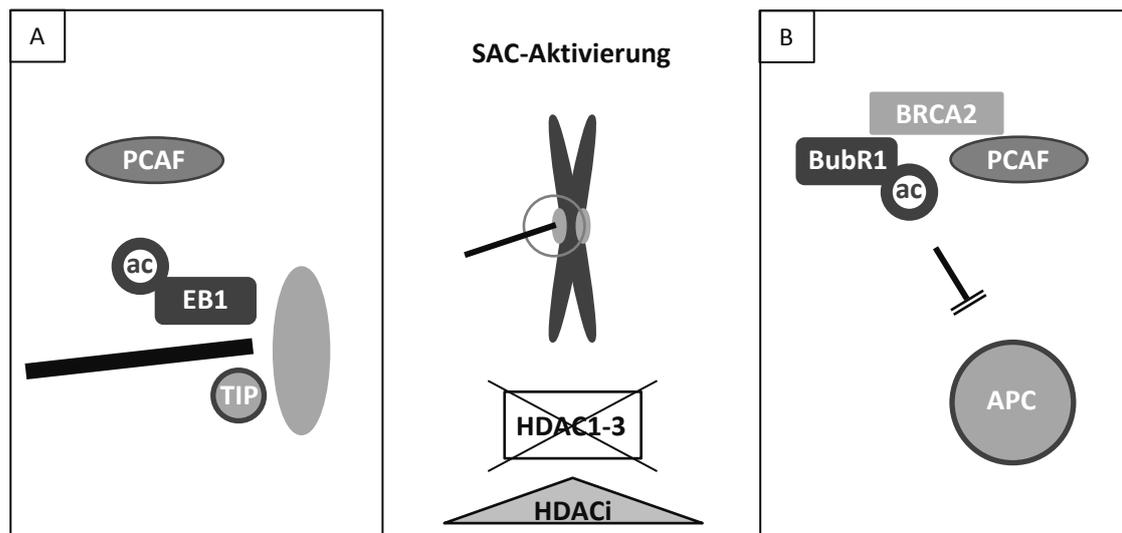


Abbildung 37: Einfluss der Acetylierung von Spindelproteinen auf die Aktivierung des Spindel-Kontrollpunkts

Dieses Modell erklärt die Aktivierung des Spindel-Kontrollpunkts (SAC) und den damit einhergehenden Metaphasearrest von Zellen nach Behandlung mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) über eine Inhibition der Histon-Deacetylase 1-3. Interaktionen dieser HDACs mit Spindelproteinen wurden bereits nachgewiesen. A) EB1 lokalisiert an den wachsenden Mikrotubulienden, wo es mit TIPs (*plus-end tracking proteins*) die Mikrotubuli-Kinetochor-Bindung stabilisiert. Acetylierung durch PCAF reduziert die stabilisierende Wirkung auf die Mikrotubuli, wodurch die detektierte Zugspannung an den Kinetochoren reduziert und SAC aktiviert wird. B) BRCA2 bildet ein Gerüst für die Interaktion von BubR1 und seiner Acetyltransferase PCAF. Während deacetyliertes BubR1 vom Anaphase-promovierenden Komplex APC abgebaut wird, führt acetyliertes BubR1 zur Inhibition von APC, wodurch die Initiation der Anaphase verhindert wird.

Da C2 in geringer Dosierung ähnliche Effekte auf die Signalübertragung zeigt wie C5, stellt sich die Frage, wie es zu dieser analogen Wirkung kommt. C5 verhindert durch Inhibition von Eg5 die Ausbildung bipolarer Spindeln, wodurch an den Kinetochoren eine verringerte Zugspannung detektiert und der Spindel-Kontrollpunkt aktiviert wird. Bei den Prozessen rund um die Aktivierung des Spindel-Kontrollpunkts spielen auch Acetylierungen eine wesentliche Rolle. Möglicherweise liegen hierin die ähnlichen Effekte von C2 und C5 begründet.

Eine Aktivierung des Spindel-Kontrollpunkts durch hyperacetyliertes EB1 zeigen Xia *et al.* (2012; Abbildung 37 A). EB1 ist in der Mitose an den wachsenden Mikrotubulienden lokalisiert und stabilisiert durch Bindung von TIPs (*plus-end tracking protein*) die Interaktionen zwischen Mikrotubuli und Kinetochoren. Durch PCAF wird EB1 in der Metaphase acetyliert, was die stabilisierende Wirkung auf die Mikrotubuli-Kinetochor-Interaktionen reduziert. Dadurch wird an den Kinetochoren eine verringerte Zugspannung detektiert und der Spindel-Kontrollpunkt wird aktiviert, um fehlerhafte Anbindungen zu korrigieren. Ob EB1 durch HDACs deacetyliert wird, ist bisher nicht bekannt, jedoch könnte eine inhibierte Deacetylierung von EB1 durch C2 eine Aktivierung des Spindel-Kontrollpunkts und somit den Mitosearrest zur Folge haben.

BubR1 ist ebenfalls an der Regulation des Spindel-Kontrollpunkts beteiligt, indem es durch Bindung an Kinetochore die bipolare Spindelanbindung sicherstellt. Im Komplex mit BRCA2 und PCAF wird BubR1 in der Prometaphase acetyliert und inhibiert daraufhin den Anaphase-promovierenden Komplex APC (Abbildung 37 B). Erst wenn alle Bedingungen des Spindel-Kontrollpunkts erfüllt sind, wird die Acetylierung von BubR1 reduziert und der aktivierte APC baut BubR1 ab (Choi *et al.* 2009, 2012). Ob Histon-Deacetylasen für eine direkte Deacetylierung von BubR1 sorgen, oder ob nur die Acetylierung über PCAF reduziert wird, ist nicht bekannt. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Histon-Deacetylasen 1-3, Mitglieder der HDAC-Klasse I, welche von C2 inhibiert werden, an BubR1 binden können (Choi *et al.* 2009). Des Weiteren zeigten Ishii *et al.* (2008), dass HDAC3 in der Mitose an den Mikrotubuli lokalisiert und für die Kinetochor-Mikrotubuli-Anbindung essentiell ist, indem es durch Acetylierung mitotischer Spindelproteine die Spindelfunktion reguliert. Die Inhibition von HDAC3 mit Trichostatin A verhinderte eine korrekte Anbindung der Mikrotubuli an die Kinetochore, wodurch kein korrektes Chromosomenalignment möglich war und der Spindel-Kontrollpunkt aktiviert wurde. Somit gibt es verschiedene Hinweise auf eine Beteiligung von HDAC1-3 am Spindel-Kontrollpunkt. Insgesamt scheint eine Acetylierung der beteiligten Proteine die Aktivierung des Kontrollpunkts und somit den Mitosearrest zur Folge zu haben. Diese verstärkte Acetylierung könnte durch Inhibition von HDAC1-3 durch C2 erfolgen und somit zu ähnlichen Effekte wie die Inhibition von Eg5 durch C5 führen.

Der Histon-Deacetylase-Inhibitor C2 zeigte abhängig von der Behandlungskonzentration unterschiedliche Wirkprofile: Während er in hohen Konzentrationen der Hydroxamsäure C1 ähnelt, kamen bei niedrigen Konzentrationen Mechanismen zum Tragen, welche antimitotischen Substanzen ähneln.

Viele Effekte von C1 wurden der Inhibition von HSP90 über HDAC6 zugeschrieben, welche aber von C2 nicht inhibiert wird. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch HDAC1 zur Acetylierung von HSP90 führt, was die Effekte von C2 auf HSP90 und dessen Substrate Aurora A, Cdc25 und CDK erklären kann.

Die Analyse des Wirkmechanismus von C2 in niedriger Dosierung ergab eine starke Ähnlichkeit zu den bei C5 detektierten Effekten. Der Kinesin-Inhibitor C5 führt unter anderem zu einem Arrest der Zellen in der Metaphase, welcher sich auch bei C2 andeutete. Dahingegen wurden Effekte von C5, die nicht dem klassischen Wirkmechanismus von Kinesin-Inhibitoren entsprechen, bei C2 nicht detektiert. Über EB1 und BubR1 bestehen Zusammenhänge zwischen der Acetylierung von Proteinen und der Aktivierung des Spindel-Kontrollpunkts, wobei HDAC1-3 mögliche Deacetylasen von EB1 und BubR1 darstellen. Die HDAC-Inhibition durch C2 könnte somit eine verstärkte

Acetylierung von EB1 und BubR1 und dadurch eine Aktivierung des Spindel-Kontrollpunkts mit einhergehendem Mitosearrest zur Folge haben. Dies würde ähnliche Effekte von C2 und C5 erklären.

Somit konnte gezeigt werden, dass C2 abhängig von der eingesetzten Behandlungskonzentration stark unterschiedliche Effekte auf die Aktivierung und Expression von Proteinen hat. Dieses Wissen kann für die Weiterentwicklung des Wirkstoffes nutzbar gemacht werden.

6. Zusammenfassung

Das Potential neuartiger Antitumorsubstanzen kann nur durch detaillierte Analyse ihrer Wirkmechanismen voll ausgeschöpft werden. Umfassende Aktivitätsbestimmungen zellulärer Signalwegsproteine bereits in frühen Phasen der Medikamentenentwicklung eignen sich hierfür besonders. Durch Verbindung des dreidimensionalen Tumorsphäroid-Modells mit einer Mikroarray-basierten Proteinanalytik wurden in dieser Arbeit komplexe Signaltransduktionsanalysen auf Material ermöglicht, welches die Situation in humanen Tumormetastasen widerspiegelt. Dabei wurde die Wirkung von Medikamentenkandidaten aus frühen klinischen Entwicklungsphasen eingehend auf humanen Kolontumorsphäroiden analysiert.

Ein Inhibitor des mitotischen Kinesins Eg5 zeigte neben dem für diese Substanzklasse typischen mitotischen Arrest der Zellen weitere relevante Effekte. Translationsinduktion durch aktivierte mTOR- und MAPK-Signalwege sowie Induktion von Ki-67 und Phosphorylierung von Rb deuteten auf eine Überführung ruhender Zellen in den aktiven Zellzyklus hin. Der Eg5-Inhibitor scheint somit den proliferativen Zustand von Zellen zu adressieren: Während ruhende Zellen (z.B. im Sphäroidinneren) in den aktiven Zellzyklus überführt und zur Proliferation angeregt werden, werden proliferierende Zellen (z.B. in der Sphäroidperipherie) mitotisch arretiert. Dies könnte einen neuen Ansatz für die Therapie von Tumorstammzellen darstellen, welche in den aktiven Zellzyklus überführt und in dessen Verlauf abgetötet werden könnten.

Auch bei der Charakterisierung zweier Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) wurde durch Reduktion des SOX-2-Niveaus eine Wirksamkeit gegen Tumorstammzellen impliziert. Des Weiteren kam es in Tumorzellen zu einer starken Apoptoseinduktion sowie durch Hemmung von HDAC6 und HDAC1 zur Inhibition von HSP90. Bei der untersuchten Hydroxamsäure konnte zudem, wahrscheinlich bedingt durch eine verstärkte Acetylierung, eine Induktion von STAT3 und somit eine Beeinflussung des JAK-STAT-Signalwegs nachgewiesen werden. Das Benzamid-Analogon zeigte in hoher Dosierung HDACi-typische Effekte, wohingegen in geringer Dosierung ein Mitosearrest detektiert wurde. Dieser könnte infolge der inhibierten HDAC1-3-abhängigen Deacetylierung spindelassoziierter Proteine durch Aktivierung des Spindel-Kontrollpunkts verursacht werden und stellt eine bisher unbekannte Wirkung von HDACi dar.

Für drei onkologische Medikamentenkandidaten konnten mit Protein-Mikroarrays detaillierte Wirkprofile in humanen Tumorsphäroiden erstellt werden. Während bekannte Mechanismen bestätigt wurden, konnte eine Vielzahl neuer Wirkungen aufgedeckt werden, wodurch sich für die Tumorthherapie neue Möglichkeiten ergeben.

7. Abstract

To exploit the full potential of novel anticancer drugs, detailed knowledge of their mode of action is required. Comprehensive signal transduction analysis is capable of providing this information early in drug development. By combining microarray-based protein analysis with three-dimensional tumor spheroids, a system that enables signal transduction analysis on tumor-like material was established. This tumor model allows detailed mode of action analysis and was employed for studying the mode of action of novel anticancer drug candidates.

Inhibition of the mitotic kinesin Eg5 by a novel compound lead, as expected, to mitotically arrested cells. Induction of translation was seen, as indicated by active mTOR- and MAPK-signaling pathways, as well as through the increase of Ki-67, and an increase in Rb phosphorylation. These observations imply the transition of quiescent cells to the active cell cycle. Therefore, the Eg5 inhibitor is likely to address the proliferative state of the cells: While quiescent cells (e.g. cells in the spheroid center) are transferred to the active cell cycle and into proliferation, proliferating cells (e.g. cells in the spheroid periphery) are arrested mitotically. This observation could form the basis of a novel approach for the treatment of tumor stem cells, as they could be driven to enter the active cell cycle before subsequent killing.

The characterization of two novel histone deacetylase inhibitors (HDACi) also pointed to efficacy towards cancer stem cells. These compounds lead to reduction of SOX-2 levels, distinct induction of apoptosis, inhibition of HDAC6 and HDAC1 and loss of HSP90 function. One of the examined compounds, a hydroxamic acid, showed impact on JAK-STAT-signaling, as detected by induced STAT3 levels, which are likely to be associated with induced acetylation. High dosage of the second compound, a benzamide analogue, exhibited typical HDACi-effects whereas low dosage resulted in mitotically arrested cells. This might be due to an inhibition of HDAC1-3-dependent deacetylation of spindle proteins, causing activation of the spindle assembly checkpoint. This observation reveals a novel effect of HDAC inhibition.

By applying protein microarrays in combination with tumor spheroids, detailed mode of action analyses were conducted for three novel anticancer drug candidates. Known mechanisms were confirmed and a variety of new effects, that give novel opportunities for tumor therapy, were found.

8. Literaturverzeichnis

- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes a B, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Current Biology* : CB 7, 261–269.
- Alessi DR, Kozlowski MT, Weng QP, Morrice N, Avruch J (1998). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Current Biology* : CB 8, 69–81.
- Bachmeier BE, Vené R, Iancu CM, Pfeffer U, Mayer B, Noonan D, Albini A, Jochum M, Nerlich AG (2005). Transcriptional control of cell density dependent regulation of matrix metalloproteinase and TIMP expression in breast cancer cell lines. *Thrombosis and Haemostasis* 93, 761–769.
- Bali P, Pranpat M, Bradner J, Balasis M, Fiskus W, Guo F, Rocha K, Kumaraswamy S, Boyapalle S, Atadja P, Seto E, Bhalla K (2005). Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 26729–26734.
- Barone M V, Crozat A, Tabae A, Philipson L, Ron D (1994). CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G1/S arrest. *Genes & Development* 8, 453–464.
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh T-Y, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823–837.
- Bertran MT, Sdelci S, Regué L, Avruch J, Caelles C, Roig J (2011). Nek9 is a Plk1-activated kinase that controls early centrosome separation through Nek6/7 and Eg5. *The EMBO Journal* 30, 2634–2647.
- Berx G, Van Roy F (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1, a003129.
- Birk M, Bürkle A, Pekari K, Maier T, Schmidt M (2012). Cell cycle-dependent cytotoxicity and mitotic spindle checkpoint dependency of investigational and approved antimitotic agents. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 130, 798–807.
- Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CS, Novotny M, Slamon DJ, Plowman GD (1998). A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *The EMBO Journal* 17, 3052–3065.
- Blangy A, Lane H a, D'Hérin P, Harper M, Kress M, Nigg E a (1995). Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* 83, 1159–1169.
- Blasco M a (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews. Genetics* 6, 611–622.
- Bock I, Kudithipudi S, Tamas R, Kungulovski G, Dhayalan A, Jeltsch A (2011). Application of Celluspot peptide arrays for the analysis of the binding specificity of epigenetic reading domains to modified histone tails. *BMC Biochemistry* 12, 48.
- Bonneau AM, Sonenberg N (1987). Involvement of the 24-kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis. *The Journal of Biological Chemistry* 262, 11134–11139.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Braeuning A, Heubach Y, Knorpp T, Kowalik MA, Templin M, Columbano A, Schwarz M (2011). Gender-specific interplay of signaling through β -catenin and CAR in the regulation of xenobiotic-induced hepatocyte proliferation. *Toxicological Sciences : an Official Journal of the Society of Toxicology* 123, 113–122.

- Brattain MG, Brattain DE, Sarrif AM, McRae LJ, Fine WD, Hawkins JG (1982). Enhancement of growth of human colon tumor cell lines by feeder layers of murine fibroblasts. *Journal of the National Cancer Institute* 69, 767–771.
- Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J, Brattain DE (1981). Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Research* 41, 1751–1756.
- Brunet A, Pagès G, Pouyssegur J (1994). Constitutively active mutants of MAP kinase kinase (MEK1) induce growth factor-relaxation and oncogenicity when expressed in fibroblasts. *Oncogene* 9, 3379–3387.
- Brunn GJ, Hudson CC, Sekulić A, Williams JM, Hosoi H, Houghton PJ, Lawrence JC, Abraham RT (1997). Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science (New York, N.Y.)* 277, 99–101.
- Bua DJ, Kuo AJ, Cheung P, Liu CL, Migliori V, Espejo A, Casadio F, Bassi C, Amati B, Bedford MT, Guccione E, Gozani O (2009). Epigenome microarray platform for proteome-wide dissection of chromatin-signaling networks. *PLoS One* 4, e6789.
- Burke DJ, Stukenberg PT (2008). Linking kinetochore-microtubule binding to the spindle checkpoint. *Developmental Cell* 14, 474–479.
- Burkhardt DL, Sage J (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews. Cancer* 8, 671–682.
- Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM (1998). RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 1432–1437.
- Campos EI, Reinberg D (2009). Histones: annotating chromatin. *Annual Review of Genetics* 43, 559–599.
- Carlsson J, Yuhas JM (1984). Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progrès Dans Les Recherches Sur Le Cancer* 95, 1–23.
- Cha T-L, Chuang M-J, Wu S-T, Sun G-H, Chang S-Y, Yu D-S, Huang S-M, Huan SK-H, Cheng T-C, Chen T-T, Fan P-L, Hsiao P-W (2009). Dual degradation of aurora A and B kinases by the histone deacetylase inhibitor LBH589 induces G2-M arrest and apoptosis of renal cancer cells. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15, 840–850.
- Chang TT, Hughes-Fulford M (2009). Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes. *Tissue Engineering. Part A* 15, 559–567.
- Choi E, Choe H, Min J, Choi JY, Kim J, Lee H (2009). BubR1 acetylation at prometaphase is required for modulating APC/C activity and timing of mitosis. *The EMBO Journal* 28, 2077–2089.
- Choi E, Park P-G, Lee H-O, Lee Y-K, Kang GH, Lee JW, Han W, Lee HC, Noh D-Y, Lekomtsev S, Lee H (2012). BRCA2 fine-tunes the spindle assembly checkpoint through reinforcement of BubR1 acetylation. *Developmental Cell* 22, 295–308.
- Chong H, Lee J, Guan KL (2001). Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *The EMBO Journal* 20, 3716–3727.
- Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen J V, Mann M (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science (New York, N.Y.)* 325, 834–840.
- Choudhary C, Mann M (2010). Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11, 427–439.

- Clayton a L, Rose S, Barratt MJ, Mahadevan LC (2000). Phosphoacetylation of histone H3 on c-fos- and c-jun-associated nucleosomes upon gene activation. *The EMBO Journal* 19, 3714–3726.
- Collins I, Workman P (2006). New approaches to molecular cancer therapeutics. *Nature Chemical Biology* 2, 689–700.
- Cotter TG (2009). Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature Reviews. Cancer* 9, 501–507.
- Van Cutsem E, Köhne C-H, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien C-R, Makhson A, D'Haens G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, ... Rougier P (2009). Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 360, 1408–1417.
- Dai Y, Rahmani M, Dent P, Grant S (2005). Blockade of histone deacetylase inhibitor-induced RelA/p65 acetylation and NF-kappaB activation potentiates apoptosis in leukemia cells through a process mediated by oxidative damage, XIAP downregulation, and c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *Molecular and Cellular Biology* 25, 5429–5444.
- Dalby KN, Morrice N, Caudwell FB, Avruch J, Cohen P (1998). Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90rsk that are inducible by MAPK. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 1496–1505.
- Damjanov I, Horvat B, Gibas Z (1993). Retinoic acid-induced differentiation of the developmentally pluripotent human germ cell tumor-derived cell line, NCCIT. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 68, 220–232.
- Dar A a, Goff LW, Majid S, Berlin J, El-Rifai W (2010). Aurora kinase inhibitors--rising stars in cancer therapeutics? *Molecular Cancer Therapeutics* 9, 268–278.
- Dawson M a, Kouzarides T (2012). Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 150, 12–27.
- Deacon K, Mistry P, Chernoff J, Blank JL, Patel R (2003). p38 Mitogen-activated protein kinase mediates cell death and p21-activated kinase mediates cell survival during chemotherapeutic drug-induced mitotic arrest. *Molecular Biology of the Cell* 14, 2071–2087.
- Deak M, Clifton a D, Lucocq LM, Alessi DR (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *The EMBO Journal* 17, 4426–4441.
- Dedes KJ, Dedes I, Imesch P, Von Bueren AO, Fink D, Fedier A (2009). Acquired vorinostat resistance shows partial cross-resistance to “second-generation” HDAC inhibitors and correlates with loss of histone acetylation and apoptosis but not with altered HDAC and HAT activities. *Anti-cancer Drugs* 20, 321–333.
- Dephoure N, Zhou C, Villén J, Beausoleil S a, Bakalarski CE, Elledge SJ, Gygi SP (2008). A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 10762–10767.
- Deubzer HE, Schier MC, Oehme I, Lodrini M, Haendler B, Sommer A, Witt O (2012). HDAC11 is a novel drug target in carcinomas. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 1–9.
- Dexter DL, Barbosa JA, Calabresi P (1979). N,N-dimethylformamide-induced alteration of cell culture characteristics and loss of tumorigenicity in cultured human colon carcinoma cells. *Cancer Research* 39, 1020–1025.
- Duveneck GL, Pawlak M, Neuschäfer D, Bär E, Budach W, Pielies U, Ehrat M (1997). Novel bioaffinity sensors for trace analysis based on luminescence excitation by planar waveguides. *Sensors and Actuators B: Chemical* 38, 88–95.

Duvic M, Talpur R, Ni X, Zhang C, Hazarika P, Kelly C, Chiao JH, Reilly JF, Ricker JL, Richon VM, Frankel SR (2007). Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood* 109, 31–39.

Dyson MH, Thomson S, Inagaki M, Goto H, Arthur SJ, Nightingale K, Iborra FJ, Mahadevan LC (2005). MAP kinase-mediated phosphorylation of distinct pools of histone H3 at S10 or S28 via mitogen- and stress-activated kinase 1/2. *Journal of Cell Science* 118, 2247–2259.

Dérjard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76, 1025–1037.

D'haeseleer P (2005). How does gene expression clustering work? *Nature Biotechnology* 23, 1499–1501.

Ekins RP (1989). Multi-analyte immunoassay. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 7, 155–168.

Ekins RP, Chu FW (1991). Multianalyte microspot immunoassay--microanalytical "compact disk" of the future. *Clinical Chemistry* 37, 1955–1967.

Elledge SJ (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science (New York, N.Y.)* 274, 1664–1672.

Endl E, Gerdes J (2000). The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Experimental Cell Research* 257, 231–237.

Van den Engel NK, Winter H, Rüttinger D, Shau I, Schiller M, Mayer B, Moudgil T, Meimarakis G, Stolte M, Jauch K-W, Fox B a, Hatz R a (2006). Characterization of immune responses in gastric cancer patients: a possible impact of *H. pylori* to polarize a tumor-specific type 1 response? *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 120, 285–296.

Engvall E, Perlmann P (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871–874.

Esteller M (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21, 5427–5440.

Fan H, Penman S (1970). Regulation of protein synthesis in mammalian cells. II. Inhibition of protein synthesis at the level of initiation during mitosis. *Journal of Molecular Biology* 50, 655–670.

Fantin VR, Loboda A, Paweletz CP, Hendrickson RC, Pierce JW, Roth J a, Li L, Gooden F, Korenchuk S, Hou XS, Harrington E a, Randolph S, Reilly JF, ... Richon VM (2008). Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription predicts vorinostat resistance in cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Research* 68, 3785–3794.

Ferenz NP, Gable A, Wadsworth P (2010). Mitotic functions of kinesin-5. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21, 255–259.

Fogh J, Trempe G (1975). New human tumor cell lines in human tumor cells in vitro. *Human Tumor Cells in Vitro* 115–159.

Fouladi M (2006). Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Investigation* 24, 521–527.

Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart L a (2007a). Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge? *International Journal of Radiation Biology* 83, 849–871.

Friedrich J, Eder W, Castaneda J, Doss M, Huber E, Ebner R, Kunz-Schughart L a (2007b). A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay. *Journal of Biomolecular Screening* 12, 925–937.

- Gaedtke L, Thoenes L, Culmsee C, Mayer B, Wagner E (2007). Proteomic analysis reveals differences in protein expression in spheroid versus monolayer cultures of low-passage colon carcinoma cells. *Journal of Proteome Research* 6, 4111–4118.
- Gammoh N, Lam D, Puente C, Ganley I, Marks P a, Jiang X (2012). Role of autophagy in histone deacetylase inhibitor-induced apoptotic and nonapoptotic cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 6561–6565.
- García-Morales P, Carrasco-García E, Ruiz-Rico P, Martínez-Mira R, Menéndez-Gutiérrez MP, Ferragut J a, Saceda M, Martínez-Lacaci I (2007). Inhibition of Hsp90 function by ansamycins causes downregulation of cdc2 and cdc25c and G(2)/M arrest in glioblastoma cell lines. *Oncogene* 26, 7185–7193.
- Gascoigne KE, Taylor SS (2008). Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. *Cancer Cell* 14, 111–122.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 133, 1710–1715.
- Germain D, Frank D a (2007). Targeting the cytoplasmic and nuclear functions of signal transducers and activators of transcription 3 for cancer therapy. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13, 5665–5669.
- Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research* 12, 264–265.
- Giet R, Glover DM (2001). Drosophila aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *The Journal of Cell Biology* 152, 669–682.
- Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG, Davidsen SK (2003). Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Molecular Cancer Therapeutics* 2, 151–163.
- Goloudina A, Yamaguchi H, Chervyakova DB, Appella E, Fornace AJ, Bulavin D V (2003). Regulation of human Cdc25A stability by Serine 75 phosphorylation is not sufficient to activate a S phase checkpoint. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 2, 473–478.
- Goto H, Yasui Y, Nigg E a, Inagaki M (2002). Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 7, 11–17.
- De Gramont a, Figuer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, ... Bonetti A (2000). Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 18, 2938–2947.
- Gregory PD, Wagner K, Hörz W (2001). Histone acetylation and chromatin remodeling. *Experimental Cell Research* 265, 195–202.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883–899.
- Gurley LR, D'Anna J a, Barham SS, Deaven LL, Tobey R a (1978). Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 84, 1–15.
- Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R (2000). Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 9390–9395.

- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and Cellular Biology* 19, 1720–1730.
- Haab BB, Dunham MJ, Brown PO (2001). Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biology* 2, RESEARCH0004.
- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature Reviews. Genetics* 10, 32–42.
- Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, Grozinger CM, Schreiber SL (2003). Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4389–4394.
- Hanahan D, Folkman J (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353–364.
- Hanahan D, Weinberg R a (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Harding HP, Zhang Y, Ron D (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271–274.
- Heesom KJ, Gampel A, Mellor H, Denton RM (2001). Cell cycle-dependent phosphorylation of the translational repressor eIF-4E binding protein-1 (4E-BP1). *Current Biology : CB* 11, 1374–1379.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)* 324, 1029–1033.
- Hendzel MJ, Wei Y, Mancini M a, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106, 348–360.
- Hess-Stumpp H, Bracker TU, Henderson D, Politz O (2007). MS-275, a potent orally available inhibitor of histone deacetylases--the development of an anticancer agent. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 1388–1405.
- Heubach Y, Planatscher H, Sommersdorf C, Maisch D, Maier J, Joos TO, Templin MF, Poetz O (2013). From Spots to Beads - PTM-peptide bead arrays for the characterisation of anti-histone antibodies. *Proteomics*.
- Heyse S, Vogel H, Sanger M, Sigrist H (1995). Covalent attachment of functionalized lipid bilayers to planar waveguides for measuring protein binding to biomimetic membranes. *Protein Science : a Publication of the Protein Society* 4, 2532–2544.
- Hinz M, Broemer M, Arslan SC, Otto A, Mueller E-C, Dettmer R, Scheidereit C (2007). Signal responsiveness of I κ B kinases is determined by Cdc37-assisted transient interaction with Hsp90. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 32311–32319.
- Hoeppe S, Schreiber TD, Planatscher H, Zell A, Templin MF, Stoll D, Joos TO, Poetz O (2011). Targeting peptide termini, a novel immunoaffinity approach to reduce complexity in mass spectrometric protein identification. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 10, M110.002857.
- Holtfreter J (1944). A study of the mechanics of gastrulation. *Journal of Experimental Zoology* 95, 171–212.
- Van Hooser a, Goodrich DW, Allis CD, Brinkley BR, Mancini M a (1998). Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *Journal of Cell Science* 111 (Pt 2, 3497–3506.

- Hsu JY, Sun ZW, Li X, Reuben M, Tatchell K, Bishop DK, Grushcow JM, Brame CJ, Caldwell J a, Hunt DF, Lin R, Smith MM, Allis CD (2000). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 102, 279–291.
- Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang X-F, Yao T-P (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455–458.
- Humblet Y (2004). Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 5, 1621–1633.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, ... Kabbinavar F (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 350, 2335–2342.
- Huszar D, Theoclitou M-E, Skolnik J, Herbst R (2009). Kinesin motor proteins as targets for cancer therapy. *Cancer Metastasis Reviews* 28, 197–208.
- Hwang JJ, Kim YS, Kim MJ, Jang S, Lee J-H, Choi J, Ro S, Hyun Y-L, Lee JS, Kim C-S (2009). A novel histone deacetylase inhibitor, CG0006, induces cell death through both extrinsic and intrinsic apoptotic pathways. *Anti-cancer Drugs* 20, 815–821.
- Impey S, McCorkle SR, Cha-Molstad H, Dwyer JM, Yochum GS, Boss JM, McWeeney S, Dunn JJ, Mandel G, Goodman RH (2004). Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell* 119, 1041–1054.
- Ishii S, Kurasawa Y, Wong J, Yu-Lee L-Y (2008). Histone deacetylase 3 localizes to the mitotic spindle and is required for kinetochore-microtubule attachment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 4179–4184.
- Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC, Trent JM, Staudt LM, Hudson J, Boguski MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D, Brown PO (1999). The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science (New York, N.Y.)* 283, 83–87.
- Izumi T, Walker DH, Maller JL (1992). Periodic changes in phosphorylation of the *Xenopus cdc25* phosphatase regulate its activity. *Molecular Biology of the Cell* 3, 927–939.
- Jackson JR, Patrick DR, Dar MM, Huang PS (2007). Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? *Nature Reviews. Cancer* 7, 107–117.
- Jenuwein T, Allis CD (2001). Translating the histone code. *Science (New York, N.Y.)* 293, 1074–1080.
- Jiang B-H, Liu L-Z (2009). PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Advances in Cancer Research* 102, 19–65.
- Johnston PA, Grandis JR (2011). STAT3 signaling: anticancer strategies and challenges. *Molecular Interventions* 11, 18–26.
- Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Derry WB, Copp H, Wilson L (1996). Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Research* 56, 816–825.
- Jordan MA, Wilson L (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews. Cancer* 4, 253–265.
- Junttila MR, Evan GI (2009). p53--a Jack of all trades but master of none. *Nature Reviews. Cancer* 9, 821–829.
- Jürgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 4997–5002.

Kakahana M, Ohira T, Chan D, Webster RB, Kato H, Drabkin H a, Gemmill RM (2009). Induction of E-cadherin in lung cancer and interaction with growth suppression by histone deacetylase inhibition. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 4, 1455–1465.

Kapoor TM, Mayer TU, Coughlin ML, Mitchison TJ (2000). Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *The Journal of Cell Biology* 150, 975–988.

Karin M (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441, 431–436.

Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP (2003). The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* 115, 727–738.

Van Der Kelen K, Beyaert R, Inzé D, De Veylder L (2009). Translational control of eukaryotic gene expression. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 44, 143–168.

Kelland LR (2004). Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* 40, 827–836.

Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK (2003). Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnology and Bioengineering* 83, 173–180.

Khan N, Jeffers M, Kumar S, Hackett C, Boldog F, Khramtsov N, Qian X, Mills E, Berghs SC, Carey N, Finn PW, Collins LS, Tumber A, ... Sehested M (2008). Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *The Biochemical Journal* 409, 581–589.

Khan O, La Thangue NB (2012). HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunology and Cell Biology* 90, 85–94.

Knipstein J, Gore L (2011). Entinostat for treatment of solid tumors and hematologic malignancies. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 20, 1455–1467.

Knorpp T (2008). Untersuchung der differenziellen Aktivierung von zellulären Signalübertragungswegen in Maus-Lebertumoren mit Mutationen im Ha-ras-, B-raf- oder Ctnnb1-Onkogen mit Protein-Mikroarray-basierten Methoden. Dissertation Tübingen.

Kops GJPL, Weaver B a a, Cleveland DW (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature Reviews. Cancer* 5, 773–785.

Kouzarides T (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705.

Kramer S (2006). Mikroarray-basierende Proteomanalyse zur Detektion tumorspezifischer Markerproteine in Nierenzellkarzinomen. Dissertation Tübingen.

Kubicek M, Pacher M, Abraham D, Podar K, Eulitz M, Baccarini M (2002). Dephosphorylation of Ser-259 regulates Raf-1 membrane association. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 7913–7919.

Kunz-Schughart L a, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R (2004). The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *Journal of Biomolecular Screening* 9, 273–285.

Kuo MH, Allis CD (1999). In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods (San Diego, Calif.)* 19, 425–433.

Kurzeder C, Koppold B, Sauer G, Pabst S, Kreienberg R, Deissler H (2007). CD9 promotes adeno-associated virus type 2 infection of mammary carcinoma cells with low cell surface expression of heparan sulphate proteoglycans. *International Journal of Molecular Medicine* 19, 325–333.

- Kwon YG, Lee SY, Choi Y, Greengard P, Nairn C (1997). Cell cycle-dependent phosphorylation of mammalian protein phosphatase 1 by cdc2 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2168–2173.
- LaBonte MJ, Wilson PM, Fazzone W, Groshen S, Lenz H-J, Ladner RD (2009). DNA microarray profiling of genes differentially regulated by the histone deacetylase inhibitors vorinostat and LBH589 in colon cancer cell lines. *BMC Medical Genomics* 2, 67.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lawlor ER, Scheel C, Irving J, Sorensen PHB (2002). Anchorage-independent multi-cellular spheroids as an in vitro model of growth signaling in Ewing tumors. *Oncogene* 21, 307–318.
- Lee CW, Bélanger K, Rao SC, Petrella TM, Tozer RG, Wood L, Savage KJ, Eisenhauer EA, Synold TW, Wainman N, Seymour L (2008). A phase II study of ispinesib (SB-715992) in patients with metastatic or recurrent malignant melanoma: a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trial. *Investigational New Drugs* 26, 249–255.
- Lee H, Herrmann A, Deng J-H, Kujawski M, Niu G, Li Z, Forman S, Jove R, Pardoll DM, Yu H (2009a). Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer Cell* 15, 283–293.
- Lee H, Zhang P, Herrmann A, Yang C, Xin H, Wang Z, Hoon DSB, Forman SJ, Jove R, Riggs AD, Yu H (2012). Acetylated STAT3 is crucial for methylation of tumor-suppressor gene promoters and inhibition by resveratrol results in demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 7765–7769.
- Lee J-L, Wang M-J, Chen J-Y (2009b). Acetylation and activation of STAT3 mediated by nuclear translocation of CD44. *The Journal of Cell Biology* 185, 949–957.
- Leizerman I, Avunie-Masala R, Elkabets M, Fich A, Gheber L (2004). Differential effects of monastrol in two human cell lines. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 61, 2060–2070.
- Li D, Marchenko ND, Moll UM (2011). SAHA shows preferential cytotoxicity in mutant p53 cancer cells by destabilizing mutant p53 through inhibition of the HDAC6-Hsp90 chaperone axis. *Cell Death and Differentiation* 18, 1904–1913.
- Li L, Bhatia R (2011). Stem cell quiescence. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17, 4936–4941.
- Lin R-Z, Lin R-Z, Chang H-Y (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal* 3, 1172–1184.
- Lindemann RK, Gabrielli B, Johnstone RW (2004). Histone-deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 3, 779–788.
- Liu Y-L, Yang P-M, Shun C-T, Wu M-S, Weng J-R, Chen C-C (2010). Autophagy potentiates the anti-cancer effects of the histone deacetylase inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Autophagy* 6, 1057–1065.
- Liu Z, Xing M (2012). Induction of sodium/iodide symporter (NIS) expression and radioiodine uptake in non-thyroid cancer cells. *PLoS One* 7, e31729.
- Lobjois V, Frongia C, Jozan S, Truchet I, Valette A (2009). Cell cycle and apoptotic effects of SAHA are regulated by the cellular microenvironment in HCT116 multicellular tumour spheroids. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* 45, 2402–2411.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260.

- Luong QT, O'Kelly J, Braunstein GD, Hershman JM, Koeffler HP (2006). Antitumor activity of suberoylanilide hydroxamic acid against thyroid cancer cell lines in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12, 5570–5577.
- Ma XM, Blenis J (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10, 307–318.
- Macůrek L, Lindqvist A, Lim D, Lampson M a, Klompaker R, Freire R, Clouin C, Taylor SS, Yaffe MB, Medema RH (2008). Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* 455, 119–123.
- Madlener S, Rosner M, Krieger S, Giessrigl B, Gridling M, Vo TPN, Leisser C, Lackner A, Raab I, Grusch M, Hengstschläger M, Dolznig H, Krupitza G (2009). Short 42 degrees C heat shock induces phosphorylation and degradation of Cdc25A which depends on p38MAPK, Chk2 and 14.3.3. *Human Molecular Genetics* 18, 1990–2000.
- Magnuson B, Ekim B, Fingar DC (2012). Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *The Biochemical Journal* 441, 1–21.
- Mandl-Weber S, Meinel FG, Jankowsky R, Oduncu F, Schmidmaier R, Baumann P (2010). The novel inhibitor of histone deacetylase resminostat (RAS2410) inhibits proliferation and induces apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *British Journal of Haematology* 149, 518–528.
- Mardin BR, Agircan FG, Lange C, Schiebel E (2011). Plk1 controls the Nek2A-PP1 γ antagonism in centrosome disjunction. *Current Biology : CB* 21, 1145–1151.
- Marks P a, Breslow R (2007). Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nature Biotechnology* 25, 84–90.
- Marks PA (2010). The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 19, 1049–1066.
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jürgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prévost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G (1998). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science (New York, N.Y.)* 281, 2027–2031.
- Mason CS, Springer CJ, Cooper RG, Superti-Furga G, Marshall CJ, Marais R (1999). Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *The EMBO Journal* 18, 2137–2148.
- Mayer B, Klement G, Kaneko M, Man S, Jothy S, Rak J, Kerbel RS (2001). Multicellular gastric cancer spheroids recapitulate growth pattern and differentiation phenotype of human gastric carcinomas. *Gastroenterology* 121, 839–852.
- Mayer TU (1999). Small Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity Identified in a Phenotype-Based Screen. *Science* 286, 971–974.
- McManus KJ, Hendzel MJ (2006). The relationship between histone H3 phosphorylation and acetylation throughout the mammalian cell cycle. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 84, 640–657.
- Mellor HR, Ferguson DJP, Callaghan R (2005). A model of quiescent tumour microregions for evaluating multicellular resistance to chemotherapeutic drugs. *British Journal of Cancer* 93, 302–309.
- Meyuhas O (2008). Physiological roles of ribosomal protein S6: one of its kind. *International Review of Cell and Molecular Biology* 268, 1–37.
- Miki H, Okada Y, Hirokawa N (2005). Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends in Cell Biology* 15, 467–476.
- Ming L, Wang P, Bank A, Yu J, Zhang L (2006). PUMA Dissociates Bax and Bcl-X(L) to induce apoptosis in colon cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 16034–16042.

- Mitsiades CS, Poulaki V, McMullan C, Negri J, Fanourakis G, Goudopoulou A, Richon VM, Marks P a, Mitsiades N (2005). Novel histone deacetylase inhibitors in the treatment of thyroid cancer. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11, 3958–3965.
- Mollapour M, Neckers L (2012). Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1823, 648–655.
- Moscona A, Moscona H (1952). The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *Journal of Anatomy* 86, 287–301.
- Mueller MM, Fusenig NE (2004). Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature Reviews. Cancer* 4, 839–849.
- Musacchio A, Salmon ED (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8, 379–393.
- Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD (2010). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11, 220–228.
- Nelson JD, Denisenko O, Bomszyk K (2006). Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. *Nature Protocols* 1, 179–185.
- Nguyen A, Su L, Campbell B, Poulin NM, Nielsen TO (2009). Synergism of heat shock protein 90 and histone deacetylase inhibitors in synovial sarcoma. *Sarcoma* 2009, 794901.
- Niault TS, Baccharini M (2010). Targets of Raf in tumorigenesis. *Carcinogenesis* 31, 1165–1174.
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37–43.
- Nicholson KM, Bibby MC, Phillips RM (1997). Influence of drug exposure parameters on the activity of paclitaxel in multicellular spheroids. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* 33, 1291–1298.
- Nielsen UB, Cardone MH, Sinsky AJ, MacBeath G, Sorger PK (2003). Profiling receptor tyrosine kinase activation by using Ab microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 9330–9335.
- Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Takeuchi S, Koeffler HP, Yokoyama A (2008). MS-275, a novel histone deacetylase inhibitor with selectivity against HDAC1, induces degradation of FLT3 via inhibition of chaperone function of heat shock protein 90 in AML cells. *Leukemia Research* 32, 1382–1392.
- Novotny-Diermayr V, Sangthongpitag K, Hu CY, Wu X, Sausgruber N, Yeo P, Greicius G, Pettersson S, Liang AL, Loh YK, Bonday Z, Goh KC, Hentze H, ... Wood JM (2010). SB939, a novel potent and orally active histone deacetylase inhibitor with high tumor exposure and efficacy in mouse models of colorectal cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 9, 642–652.
- Ola MS, Nawaz M, Ahsan H (2011). Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 351, 41–58.
- Owonikoko TK, Ramalingam SS, Kanterewicz B, Balius TE, Belani CP, Hershberger P a (2010). Vorinostat increases carboplatin and paclitaxel activity in non-small-cell lung cancer cells. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 126, 743–755.
- O'Connor JPB, Carano R a D, Clamp AR, Ross J, Ho CCK, Jackson A, Parker GJM, Rose CJ, Peale F V, Friesenhahn M, Mitchell CL, Watson Y, Roberts C, ... Jayson GC (2009). Quantifying antivascular effects of monoclonal antibodies to vascular endothelial growth factor: insights from imaging. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15, 6674–6682.

Pagès G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Meloche S, Pouyssegur J (1993). Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 8319–8323.

Papin C, Denouel-Galy A, Laugier D, Calothy G, Eychène A (1998). Modulation of kinase activity and oncogenic properties by alternative splicing reveals a novel regulatory mechanism for B-Raf. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 24939–24947.

Park J-H, Jong H-S, Kim SG, Jung Y, Lee K-W, Lee J-H, Kim D-K, Bang Y-J, Kim T-Y (2008). Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective cytotoxicity through modulating Aurora-A kinase. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 86, 117–128.

Pasetto LM, Jirillo A, Iadicicco G, Rossi E, Paris MK, Monfardini S (2005). FOLFOX versus FOLFIRI: a comparison of regimens in the treatment of colorectal cancer metastases. *Anticancer Research* 25, 563–576.

Paweletz CP, Charboneau L, Bichsel VE, Simone NL, Chen T, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Roth MJ, Petricoin III EF, Liotta LA (2001). Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. *Oncogene* 20, 1981–1989.

Pawlak M, Schick E, Bopp MA, Schneider MJ, Oroszlan P, Ehrat M (2002a). Zeptosens' protein microarrays: a novel high performance microarray platform for low abundance protein analysis. *Proteomics* 2, 383–393.

Pawlak M, Schneider M, Schick E, Kresbach GM, Ehrat M (2002b). DNA- und Protein-Microarrays –Höchste Empfindlichkeit durch Planare Wellenleitertechnologie. *Laborwelt* 3, 44–48.

Peart MJ, Smyth GK, Van Laar RK, Bowtell DD, Richon VM, Marks P a, Holloway AJ, Johnstone RW (2005). Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 3697–3702.

Pende M, Um SH, Mieulet V, Sticker M, Goss VL, Mestan J, Mueller M, Fumagalli S, Kozma SC, Thomas G (2004). S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Molecular and Cellular Biology* 24, 3112–3124.

Pirnia F, Pawlak M, Thallinger GG, Gierke B, Templin MF, Kappeler A, Betticher DC, Gloor B, Borner MM (2009). Novel functional profiling approach combining reverse phase protein microarrays and human 3-D ex vivo tissue cultures: expression of apoptosis-related proteins in human colon cancer. *Proteomics* 9, 3535–3548.

Polyak K, Weinberg R a (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews. Cancer* 9, 265–273.

Portanova P, Russo T, Pellerito O, Calvaruso G, Giuliano M, Vento R, Tesoriere G (2008). The role of oxidative stress in apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid in human colon adenocarcinoma HT-29 cells. *International Journal of Oncology* 33, 325–331.

Preuss U, Landsberg G, Scheidtmann KH (2003). Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. *Nucleic Acids Research* 31, 878–885.

Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, Thomas G (1998). Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science (New York, N.Y.)* 279, 707–710.

Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T, Sonenberg N (1999). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *The EMBO Journal* 18, 270–279.

Pyronnet S, Sonenberg N (2001). Cell-cycle-dependent translational control. *Current Opinion in Genetics & Development* 11, 13–18.

Qiu L, Burgess A, Fairlie DP, Leonard H, Parsons PG, Gabrielli BG (2000). Histone deacetylase inhibitors trigger a G2 checkpoint in normal cells that is defective in tumor cells. *Molecular Biology of the Cell* 11, 2069–2083.

Ramalingam SS, Maitland ML, Frankel P, Argiris AE, Koczywas M, Gitlitz B, Thomas S, Espinoza-Delgado I, Vokes EE, Gandara DR, Belani CP (2010). Carboplatin and Paclitaxel in combination with either vorinostat or placebo for first-line therapy of advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28, 56–62.

Rao R, Fiskus W, Yang Y, Lee P, Joshi R, Fernandez P, Mandawat A, Atadja P, Bradner JE, Bhalla K (2008). HDAC6 inhibition enhances 17-AAG--mediated abrogation of hsp90 chaperone function in human leukemia cells. *Blood* 112, 1886–1893.

Ray S, Lee C, Hou T, Boldogh I, Brasier AR (2008). Requirement of histone deacetylase1 (HDAC1) in signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) nucleocytoplasmic distribution. *Nucleic Acids Research* 36, 4510–4520.

Ren S, Rollins BJ (2004). Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell* 117, 239–251.

Richmond TJ, Finch JT, Rushton B, Rhodes D, Klug A (1984). Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* 311, 532–537.

Richon VM (2006). Cancer biology: mechanism of antitumor action of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid), a novel histone deacetylase inhibitor. *British Journal of Cancer* 95, S2–S6.

Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA (2000). Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10014–10019.

Rieder CL, Maiato H (2004). Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Developmental Cell* 7, 637–651.

Rieder CL, Palazzo RE (1992). Colcemid and the mitotic cycle. *Journal of Cell Science* 102 (Pt 3), 387–392.

Roshak a K, Capper E a, Imburgia C, Fornwald J, Scott G, Marshall L a (2000). The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. *Cellular Signalling* 12, 405–411.

Rowinsky EK, Donehower RC (1995). Paclitaxel (taxol). *The New England Journal of Medicine* 332, 1004–1014.

Rowinsky EK, Eisenhauer EA, Chaudhry V, Arbuck SG, Donehower RC (1993). Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). *Seminars in Oncology* 20, 1–15.

Rubin E, Mitnacht S, Villa-Moruzzi E, Ludlow JW (2001). Site-specific and temporally-regulated retinoblastoma protein dephosphorylation by protein phosphatase type 1. *Oncogene* 20, 3776–3785.

Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, Li J, Thiagarajan M, White JA, Quackenbush J (2006). TM4 microarray software suite. *Methods in Enzymology* 411, 134–193.

Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, ... Quackenbush J (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques* 34, 374–378.

Sage J, Miller AL, Pérez-Mancera PA, Wysocki JM, Jacks T (2003). Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* 424, 223–228.

Saltz LB, Cox J V, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, Maroun JA, Ackland SP, Locker PK, Pirotta N, Elfring GL, Miller LL (2000). Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *The New England Journal of Medicine* 343, 905–914.

- Sawicka A, Seiser C (2012). Histone H3 phosphorylation - a versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie* 94, 2193–2201.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science (New York, N.Y.)* 270, 467–470.
- Scherer WF, Syverton JT, Gey GO (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *The Journal of Experimental Medicine* 97, 695–710.
- Scholzen T, Gerdes J (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* 182, 311–322.
- Shao Y, Gao Z, Marks P a, Jiang X (2004). Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 18030–18035.
- Shi J, Orth JD, Mitchison T (2008). Cell type variation in responses to antimetabolic drugs that target microtubules and kinesin-5. *Cancer Research* 68, 3269–3276.
- Shimada M, Haruta M, Niida H, Sawamoto K, Nakanishi M (2010). Protein phosphatase 1 γ is responsible for dephosphorylation of histone H3 at Thr 11 after DNA damage. *EMBO Reports* 11, 883–889.
- Shimada M, Niida H, Zineldeen DH, Tagami H, Tanaka M, Saito H, Nakanishi M (2008). Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell* 132, 221–232.
- Simboeck E, Sawicka A, Zupkovitz G, Senese S, Winter S, Dequiedt F, Ogris E, Di Croce L, Chiocca S, Seiser C (2010). A phosphorylation switch regulates the transcriptional activation of cell cycle regulator p21 by histone deacetylase inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 41062–41073.
- Soloaga A, Thomson S, Wiggin GR, Rampersaud N, Dyson MH, Hazzalin C a, Mahadevan LC, Arthur JSC (2003). MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *The EMBO Journal* 22, 2788–2797.
- Souglakos J, Philips J, Wang R, Marwah S, Silver M, Tzardi M, Silver J, Ogino S, Hooshmand S, Kwak E, Freed E, Meyerhardt J a, Saridaki Z, ... Shivdasani R a (2009). Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 101, 465–472.
- Stoll D, Templin MF, Bachmann J, Joos TO (2005). Protein microarrays: applications and future challenges. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 8, 239–252.
- Strebhardt K (2010). Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy. *Nature Reviews. Drug Discovery* 9, 643–660.
- Sun JY, Tseng H, Xu L, Hunter Z, Ciccarelli B, Fulciniti M, Zhu B, Maghsoudi K, Yang G, Gong P, Zhou Y, Liu X, Munshi NC, ... Treon SP (2011). Vorinostat induced cellular stress disrupts the p38 mitogen activated protein kinase and extracellular signal regulated kinase pathways leading to apoptosis in Waldenström macroglobulinemia cells. *Leukemia & Lymphoma* 52, 1777–1786.
- Sun P-C, Tzao C, Chen B-H, Liu C-W, Yu C-P, Jin J-S (2010). Suberoylanilide hydroxamic acid induces apoptosis and sub-G1 arrest of 320 HSR colon cancer cells. *Journal of Biomedical Science* 17, 76.
- Sutherland RM (1988). Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science (New York, N.Y.)* 240, 177–184.
- Sutherland RM, Inch WR, McCredie J a, Kruuv J (1970). A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine* 18, 491–495.

- Sylvester JE, Kron SJ (2010). A bead-based activity screen for small-molecule inhibitors of signal transduction in chronic myelogenous leukemia cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 9, 1469–1481.
- Talmadge JE, Fidler IJ (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Research* 70, 5649–5669.
- Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Ueki K, Izumi T, Chatani Y, Kohno M, Kasuga M, Yazaki Y, Akanuma Y (1992). Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 20293–20297.
- Tang PA, Siu LL, Chen EX, Hotte SJ, Chia S, Schwarz JK, Pond GR, Johnson C, Colevas AD, Synold TW, Vasist LS, Winkquist E (2008). Phase II study of ispinesib in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Investigational New Drugs* 26, 257–264.
- Tao W, South VJ, Zhang Y, Davide JP, Farrell L, Kohl NE, Sepp-Lorenzino L, Lobell RB (2005). Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage. *Cancer Cell* 8, 49–59.
- Teicher B a (2006). Tumor models for efficacy determination. *Molecular Cancer Therapeutics* 5, 2435–2443.
- Templin MF, Stoll D, Schrenk M, Traub PC, Vöhringer CF, Joos TO (2002). Protein microarray technology. *Trends in Biotechnology* 20, 160–166.
- Teshima S, Shimosato Y, Hirohashi S, Tome Y, Hayashi I, Kanazawa H, Kakizoe T (1988). Four new human germ cell tumor cell lines. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 59, 328–336.
- Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM (1995). Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81, 801–809.
- Textor M, Ruiz L, Hofer R, Rossi A, Feldman K, Hähner G, Spencer ND (2000). Structural Chemistry of Self-Assembled Monolayers of Octadecylphosphoric Acid on Tantalum Oxide Surfaces. *Langmuir* 16, 3257–3271.
- Thomson S, Clayton a L, Hazzalin C a, Rose S, Barratt MJ, Mahadevan LC (1999). The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *The EMBO Journal* 18, 4779–4793.
- Tiffon C, Adams J, Van der Fits L, Wen S, Townsend P, Ganesan A, Hodges E, Vermeer M, Packham G (2011). The histone deacetylase inhibitors vorinostat and romidepsin downmodulate IL-10 expression in cutaneous T-cell lymphoma cells. *British Journal of Pharmacology* 162, 1590–1602.
- Tirasophon W, Lee K, Callaghan B, Welihinda A, Kaufman RJ (2000). The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. *Genes & Development* 14, 2725–2736.
- Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Couteau C, Buyse M, Ganem G, Landi B, Colin P, Louvet C, De Gramont A (2004). FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 22, 229–237.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350–4354.
- Tse AN, Sheikh TN, Alan H, Chou T, Schwartz GK (2009). 90-kDa Heat Shock Protein Inhibition Abrogates the Topoisomerase I Poison-Induced G₂/M Checkpoint in p53-Null Tumor Cells by Depleting Chk1 and Wee1 □. *Journal of Biological Chemistry* 284, 124–133.

Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukuyama H, Nagata S, Fukunaga R (2004). Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development. *Molecular and Cellular Biology* 24, 6539–6549.

Valentine MT, Fordyce PM, Block SM (2006). Eg5 steps it up! *Cell Division* 1, 31.

Venkataramani V, Thiele K, Behnes CL, Wulf GG, Thelen P, Opitz L, Salinas-Riester G, Wirths O, Bayer T a, Schweyer S (2012). Amyloid precursor protein is a biomarker for transformed human pluripotent stem cells. *The American Journal of Pathology* 180, 1636–1652.

Verdel a, Curtet S, Brocard MP, Rousseaux S, Lemercier C, Yoshida M, Khochbin S (2000). Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Current Biology : CB* 10, 747–749.

Vermeulen L, De Sousa e Melo F, Richel DJ, Medema JP (2012). The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *The Lancet Oncology* 13, e83–9.

Voshol H, Ehrat M, Traenkle J, Bertrand E, Van Oostrum J (2009). Antibody-based proteomics: analysis of signaling networks using reverse protein arrays. *The FEBS Journal* 276, 6871–6879.

Walter a O, Seghezzi W, Korver W, Sheung J, Lees E (2000). The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene* 19, 4906–4916.

Wang H, Holloway MP, Ma L, Cooper Z a, Riolo M, Samkari A, Elenitoba-Johnson KSJ, Chin YE, Altura R a (2010). Acetylation directs survivin nuclear localization to repress STAT3 oncogenic activity. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 36129–36137.

Wang R, Cherukuri P, Luo J (2005). Activation of Stat3 sequence-specific DNA binding and transcription by p300/CREB-binding protein-mediated acetylation. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 11528–11534.

Wang TH, Wang HS, Soong YK (2000). Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* 88, 2619–2628.

Warburg O (1956a). On respiratory impairment in cancer cells. *Science (New York, N.Y.)* 124, 269–270.

Warburg O (1956b). On the origin of cancer cells. *Science (New York, N.Y.)* 123, 309–314.

Waskiewicz a J, Flynn A, Proud CG, Cooper J a (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *The EMBO Journal* 16, 1909–1920.

Waskiewicz AJ, Johnson JC, Penn B, Mahalingam M, Kimball SR, Cooper JA (1999). Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Molecular and Cellular Biology* 19, 1871–1880.

Weaver B a a, Cleveland DW (2005). Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell* 8, 7–12.

Welch BL (1947). The generalization of “student’s” problem when several different population variances are involved. *Biometrika* 34, 28–35.

Weng QP, Kozlowski M, Belham C, Zhang A, Comb MJ, Avruch J (1998). Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific anti-phosphopeptide antibodies. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 16621–16629.

Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Letters* 277, 8–21.

Wright JH, Munar E, Jameson DR, Andreassen PR, Margolis RL, Seger R, Krebs EG (1999). Mitogen-activated protein kinase kinase activity is required for the G(2)/M transition of the cell cycle in mammalian fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 11335–11340.

- Xia P, Wang Z, Liu X, Wu B, Wang J, Ward T, Zhang L, Ding X, Gibbons G, Shi Y, Yao X (2012). EB1 acetylation by P300/CBP-associated factor (PCAF) ensures accurate kinetochore-microtubule interactions in mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 16564–16569.
- Yokota T (2012). Are KRAS/BRAF mutations potent prognostic and/or predictive biomarkers in colorectal cancers? *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry* 12, 163–171.
- You JS, Kang JK, Seo D-W, Park JH, Park JW, Lee JC, Jeon YJ, Cho EJ, Han J-W (2009). Depletion of embryonic stem cell signature by histone deacetylase inhibitor in NCCIT cells: involvement of Nanog suppression. *Cancer Research* 69, 5716–5725.
- Yu C, Rahmani M, Conrad D, Subler M, Dent P, Grant S (2003). The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis in Bcr/Abl+ cells sensitive and resistant to STI571. *Blood* 102, 3765–3774.
- Yuan TL, Cantley LC (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27, 5497–5510.
- Yvon a M, Wadsworth P, Jordan M a (1999). Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Molecular Biology of the Cell* 10, 947–959.
- Zhang Q-L, Wang L, Zhang Y-W, Jiang X-X, Yang F, Wu W-L, Janin A, Chen Z, Shen Z-X, Chen S-J, Zhao W-L (2009). The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid to induce T-leukemia/lymphoma cells apoptosis. *Leukemia : Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 23, 1507–1514.
- Zhang X, Wang W, Yu W, Xie Y, Zhang X, Zhang Y, Ma X (2005). Development of an in vitro multicellular tumor spheroid model using microencapsulation and its application in anticancer drug screening and testing. *Biotechnology Progress* 21, 1289–1296.
- Zhou H, Li D, Song L, Liu R, Chen J, Huang X (2008a). Thr11 phosphorylated H3 is associated with centromere DNA during mitosis in MCF-7 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 311, 45–50.
- Zhou Q, Agoston AT, Atadja P, Nelson WG, Davidson NE (2008b). Inhibition of histone deacetylases promotes ubiquitin-dependent proteasomal degradation of DNA methyltransferase 1 in human breast cancer cells. *Molecular Cancer Research : MCR* 6, 873–883.
- Zlatanova J, Leuba SH, Van Holde K (1998). Chromatin fiber structure: morphology, molecular determinants, structural transitions. *Biophysical Journal* 74, 2554–2566.

9. Anhang

Tabelle 20: Primärantikörper

Die Bezeichnung der Phosphorylierungsstellen entspricht den vom Hersteller angegebenen, meist humanen, Aminosäurepositionen. Wurde ein Antigen mit mehreren Antikörpern nachgewiesen, so können diese durch die Nummerierung in eckigen Klammern unterschieden werden. Antikörperspezies (Sz), Hersteller und die in den Experimenten dieser Arbeit verwendeten Verdünnungen sind gelistet. Außerdem kann die Klassifizierung der Antikörper, welche mittels Western Blot (WB) und Peptidarray (PA) erfolgte, der Tabelle entnommen werden.

Abkürzungen: Hers – Hersteller, Verd – Verdünnung, Etab – Etablierungsphase, eingesetzt für Probenpräparation (4.1.2) oder Patienten-Sphäroide (4.2), RPPA – *Reverse Phase Protein-Mikroarray*, p – phospho, ac – acetyl, cl – gespalten (*cleaved*), me1 – monomethyl, me2 – dimethyl, me3 – trimethyl, [] – Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten, rb – Kaninchen (*rabbit*), ms – Maus, gt – Ziege (*goat*), rt – Ratte, na – nicht anwendbar; Ausführliche Angaben zum Hersteller können Tabelle 21 entnommen werden.

Nr.	Antigen	Sz	Hers	WB	PA	Verd WB	Verd RPPA Etab	Verd RPPA HT-29	Verd RPPA NCCIT
1	14-3-3 σ	gt	R&D	1		500			100
2	4E-BP1 S65p	rb	CST	3				100	100
3	AFP	rb	Ept	1					100
4	Akt	rb	CST	1			250	250	
5	Akt S473p [1]	rb	CST	2			100		
6	Akt S473p [2]	rb	CST	1				250	
7	Akt T308p	rb	CST	3				250	50
8	AMPK α T172p	rb	CST	2			250		
9	ATF6 α	rb	Acr	3				50	
10	ATM S1981p	rb	CST	na					50
11	ATR S428p	rb	CST	4					50
12	Aurora A	rb	CST	2				100	
13	Aurora A T288p	rb	CST	1				50	50
14	Aurora A/B/C T288p/T232p/T198p	rb	CST	1		2000		200	200
15	Aurora B	rb	CST	1				200	
16	Axin 2 [1]	rb	CST	1					100
17	Axin 2 [2]	gt	scbt	3					50
18	BAD S112p	ms	CST	2				250	
19	BAD S136p	rb	CST	2					50
20	BAX	rb	CST	1				250	
21	Bcl-2	rb	CST	1					100
22	Bcl-X(L)	rb	CST	1				250	100
23	β -Aktin	ms	sig	1		10000		500	
24	β -Catenin	rb	Mil	1					100
25	BIM	rb	CST	1				250	

Nr.	Antigen	Sz	Hers	WB	PA	Verd WB	Verd RPPA Etab	Verd RPPA HT-29	Verd RPPA NCCIT
26	BiP	rb	CST	1				250	
27	BMF	rb	CST	3				250	
28	BMP4	rb	Ept	2					840
29	BOK	rb	CST	3				250	
30	Brachyury	rb	Life	1					50
31	b-Raf	rb	Mil	2				250	
32	b-Raf S445p	rb	CST	4				500	
33	Calnexin	ms	BD	1				1000	
34	Calretikulin	rb	CST	2				250	
35	Caseinkinase 1 α	rb	CST	3					100
36	Caseinkinase 1 ϵ	rb	Life	3					100
37	Caseinkinase 2 α	rb	CST	1					100
38	Caspase 3	rb	CST	1				250	100
39	Caspase 3 D175cl	rb	CST	1		500		250	50
40	Caspase 8	ms	CST	1				250	
41	Caspase 8 D391cl [1]	rb	CST	3					50
42	Caspase 8 D391cl [2]	rb	CST	1					50
43	CD133	rb	CST	1				250	
44	CD44	rb	Ept	1				2500	2500
45	Cdc25A	rb	abm	1				200	
46	Cdc25A S75p	rb	abm	3				200	
47	Cdc25C	rb	Ept	2				1000	
48	CDK1	ms	CST	1				400	
49	CDK1 Y15p	rb	CST	1				100	50
50	CEA	ms	Dia	1				125	
51	Chk1 S296p	rb	CST	3					50
52	Chk1 S345p	rb	CST	3					50
53	CHOP	ms	CST	3				200	
54	c-Jun S63p	rb	CST	2					50
55	c-Jun S73p	rb	CST	2					50
56	c-Met	ms	CST	1			250		
57	c-Myc	rb	CST	2				200	200
58	c-Myc T58p/S62p	rb	Ept	1				100	100
59	c-Raf	rb	CST	1				500	
60	c-Raf S259p	rb	CST	1				250	
61	c-Raf S338p	rb	CST	2				250	
62	Cyclin A	rb	Abc	3				500	
63	Cyclin D1	ms	CST	2				250	

Nr.	Antigen	Sz	Hers	WB	PA	Verd WB	Verd RPPA Etab	Verd RPPA HT-29	Verd RPPA NCCIT
64	Cyclin E2	rb	CST	4				125	
65	DAPK3	rb	CST	3					100
66	DAPK3 T265p	rb	Abc	3					50
67	DPYD	gt	scbt	4				50	
68	EGFR	rb	Ept	1			250		
69	eIF2 α	rb	CST	1				250	
70	eIF2 α S51p [1]	rb	CST	1				250	
71	eIF2 α S51p [2]	rb	CST	2				100	100
72	eIF4E	rb	CST	1				250	
73	eIF4E S209p	rb	CST	1				250	100
74	EpCAM	rb	CST	1				250	100
75	ERK1/2	rb	CST	1			250	250	
76	ERK1/2 T202p/Y204p [1]	rb	CST	1			200		200
77	ERK1/2 T202p/Y204p [2]	rb	CST	1			250	250	50
78	FRA-1 S265p	rb	CST	1					50
79	GAPDH	rb	Abc	1			10000		10000
80	GCN5L2	rb	CST	2					100
81	GDF3	rb	Ept	1					100
82	Gpr49	rb	Ept	3					250
83	Gremlin 1	rb	Abc	3					50
84	GSK3 β S9p	rb	CST	1			250		50
85	GSS	rb	Ept	2					100
86	Ha-Ras	rb	Mil	1				500	
87	HDAC1	rb	CST	1				250	
88	HDAC2	rb	Ept	1			500	250	
89	HDAC3	rb	Ept	1					1000
90	Her2	rb	Dak	1			100	100	
91	Histon H2A.X S139p	rb	CST	1	na				50
92	Histon H2B	rb	Ept	1	na		200	5000	
93	Histon H2B K15ac	rb	Ept	2	II			1000	
94	Histon H2B K20ac	rb	Ept	4	na			10000	
95	Histon H2B K5ac [1]	rb	Ept	1	III			10000	200
96	Histon H2B K5ac [2]	rb	Mil	2	II				
97	Histon H2B K5ac [3]	rb	CST	1	III				
98	Histon H3 [1]	rb	CST	2	na				
99	Histon H3 [2]	rb	CST	1	na		500	250	
100	Histon H3 K14ac	rb	Mil	1	II				100
101	Histon H3 K18ac [1]	rb	Ept	1	III			250	

Nr.	Antigen	Sz	Hers	WB	PA	Verd WB	Verd RPPA Etab	Verd RPPA HT-29	Verd RPPA NCCIT
102	Histon H3 K18ac [2]	rb	CST	1	II				
103	Histon H3 K23ac	rb	CST	1	na			250	
104	Histon H3 K27ac	rb	Mil	2	III				
105	Histon H3 K27me3 [1]	rb	CST	1	III	1000		100	100
106	Histon H3 K27me3 [2]	rb	CST	2	I			250	
107	Histon H3 K4me1	rb	CST	1	II			100	50
108	Histon H3 K4me2	rb	Ept	1	III			10000	
109	Histon H3 K4me3	ms	Mil	2	II				
110	Histon H3 K9ac [1]	rb	CST	1	III			125	50
111	Histon H3 K9ac [2]	rb	CST	1	I				50
112	Histon H3 K9ac/K14ac	rb	Mck	1	I			5000	
113	Histon H3 K9ac/S10p	rb	CST	1	II			250	
114	Histon H3 K9me3	rb	Mil	2	II				
115	Histon H3 S10p	rb	CST	1	II			250	50
116	Histon H3 S28p [1]	rb	CST	3	III			250	
117	Histon H3 S28p [2]	rb	Mil	3	III				100
118	Histon H3 S28p [3]	rb	Mil	4	II			100	100
119	Histon H3 T11p [1]	rb	CST	4	I	1000		250	50
120	Histon H3 T11p [2]	rb	Mil	3	II				1000
121	Histon H3 T3p [1]	rb	CST	1	III			250	
122	Histon H3 T3p [2]	rb	Mil	1	II				
123	Histon H3 T6p	rb	Abc	3	na				
124	Histon H3.3 S28p/S31p	rb	Ept	4	na			1000	
125	Histon H4 [1]	rb	Abc	2	na		500		
126	Histon H4 [2]	rb	CST	2	na				
127	Histon H4 K16ac	rb	Mil	2	II			250	
128	Histon H4 K20me3	rb	Mil	3	III				
129	Histon H4 K5ac/K8ac/K12ac/K16ac	rb	Mck	3	I		100		
130	Histon H4 K8ac [1]	rb	CST	1	I			250	
131	Histon H4 K8ac [2]	rb	Ept	1	III				
132	HSP27	ms	CST	1				250	
133	HSP27 S15p	rb	Ept	1				1000	
134	HSP27 S78p	rb	CST	2				250	
135	HSP90	ms	Abc	2				200	
136	IGF1 Rezeptor	rb	Vta	2			250		
137	IGFBP-3	rb	Mil	2					50
138	I κ B α S32p	rb	CST	1					50
139	INSL4	rb	Abc	3					50

Nr.	Antigen	Sz	Hers	WB	PA	Verd WB	Verd RPPA Etab	Verd RPPA HT-29	Verd RPPA NCCIT
140	IRE1 α	rb	CST	1				200	
141	JARID1A	rb	CST	1					100
142	JNK	rb	CST	3				250	
143	JNK T183p/Y185p [1]	rb	CST	3					50
144	JNK T183p/Y185p [2]	rb	CST	2				100	100
145	JNK Y185p	rb	Ept	3				2500	
146	Ki-67	rb	scbt	2				200	
147	KLF4	rb	Mil	3					50
148	LEF1	rb	CST	1				250	
149	LRP6	rb	CST	1					100
150	LRP6 S1490p	rb	CST	2					50
151	MDM2 S166p	rb	CST	3					50
152	MDR1	ms	Mck	2			50		
153	MEK1	rb	CST	2				250	
154	MEK1/2 S217p/S221p	rb	CST	1			250	250	50
155	MEK2	rb	CST	2				250	
156	Mnk1 T250p/T255p	rb	CST	3				100	
157	MSK1	rb	CST	3				250	
158	MSK1 S360p	rb	Ept	3				2500	
159	MSK1 S376p [1]	rb	CST	1				250	100
160	MSK1 S376p [2]	rb	Mil	2				250	250
161	mTOR S2448p	rb	CST	2			250		50
162	Nanog	ms	CST	3					100
163	N-Cadherin	ms	BD	2			250		
164	NF- κ B p65	rb	CST	1				250	
165	NF- κ B p65 K310ac	rb	CST	4					50
166	NF- κ B p65 S468p	rb	CST	3				250	
167	Notch 1	rb	CST	3					100
168	Notch 1 V1744cl	rb	CST	4					50
169	Oct-4	ms	CST	4					100
170	p21	ms	CST	1		1000			
171	p27Kip1	ms	CST	1					100
172	p38 MAPK	rb	CST	2				250	
173	p38 MAPK T180p/Y182p	rb	CST	1				250	
174	p53 S392p	rb	CST	2				250	
175	p70-S6K	rb	CST	1				250	
176	p70-S6K T389p	ms	CST	3				250	50
177	PARP	rb	CST	3				1000	

Nr.	Antigen	Sz	Hers	WB	PA	Verd WB	Verd RPPA Etab	Verd RPPA HT-29	Verd RPPA NCCIT
178	PARP D214cl	rb	CST	1				250	50
179	PCAF	rb	CST	2					100
180	PCNA	rt	Kre	1			500		50
181	PERK	rb	CST	1				250	
182	PERK T981p	rb	CST	3				50	
183	PI3K p85 α	rb	Ept	1			250		
184	PKR T446p	rb	Abc	3				1000	
185	PLK1 T210p	rb	CST	3				100	50
186	PP1 α	rb	Mil	1				500	
187	PP1 α T320p	rb	Ept	2				1000	
188	PTEN	rb	CST	1				500	
189	PTEN S380p	rb	CST	3				250	50
190	Rb S807p/S811p	rb	CST	1		1000		100	100
191	RSK1 S380p	rb	CST	1			250	250	
192	RSK1 T573p	rb	Ept	1				250	
193	RSK1/2/3	rb	CST	1				250	
194	S6 ribosomales Protein	rb	CST	1				250	
195	S6 ribosomales Protein S235p/S236p	rb	CST	1		1000		250	
196	S6 ribosomales Protein S240p/S244p	rb	CST	1				250	
197	Smad2 S245p/S250p/S255p	rb	CST	2					50
198	Smad2 S465p/S467p	rb	CST	1					50
199	Smad2/3	rb	CST	2					100
200	SOX-2	rb	CST	1					100
201	SOX-9	rb	Mil	3					100
202	SSEA3	rt	Acr	3					50
203	STAT3	rb	CST	2				500	200
204	STAT3 S727p	rb	CST	2				1000	100
205	Survivin	ms	CST	2				250	100
206	Survivin T34p	rb	CST	3					50
207	TCF1	rb	CST	2				250	
208	TCF4	rb	CST	1				250	
209	Vimentin	ms	Vta	1			1x10 ⁶		
210	Zytokeratin	ms	Vta	1			20000		
211	Zytokeratin 18	ms	CST	1					100
212	Zytokeratin 4/5/6/8/10/13/18	ms	CST	1				250	
213	Zytokeratin 5/6/8/17/19	ms	Dak	1				2500	
214	Zytokeratin 8 S23p	rb	Ept	1					100

Tabelle 21: Hersteller der verwendeten Antikörper

Diese Hersteller wurden in Tabelle 20 folgendermaßen abgekürzt.

Abkürzung	Lieferant
Abc	Abcam, Cambridge, UK
abm	Applied Biochemical Materials (ABM), Richmond, BC, Kanada
Acr	Acris Antibodies, Herford
BD	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
CST	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Dak	Dako, Glostrup, Dänemark
Dia	Dianova, Hamburg
Ept	Epitomics, Burlingame, CA, USA
Kre	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München
Life	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Mck	Merck, Darmstadt
Milli	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
R&D	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
scb	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Sig	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Vta	Ventana, Tucson, AZ, USA

Tabelle 22: Probenliste

Abkürzungen: # - eindeutiger Probenbezeichner, Abst – Abstammung, Subst – Substanz, Konz – Konzentration, T – Trocknungsmethode, Lyse – Lysepuffer, Prot – Proteingehalt, 2D - Monolayer-Zellkultur, Sph – Sphäroid, Anz – Bestimmung der benötigten Sphäroidanzahl (4.1.1), Char – Antikörper-Charakterisierung mittels WB (3.2.8), Pat – Patienten-Sphäroide (4.2), Präp – Etablierung der Probenpräparation (4.1.2), RPPA – *Reverse Phase* Protein-Mikroarray, WB – Western Blot, Med – Medium, T150 – T150er Zellkulturflasche bei 80-90 % Konfluenz, 1,5x10⁵Z – 150.000 Zellen, 6-well – 1 well einer 6-well-Platte bei 90 % Konfluenz, RV - PBS wurde weitestgehend abgesaugt, Lyo – Gefriertrockner, SV - Vakuumrotationsverdampfer

#	Art	Abst	Ein- satz	Behandlung				Anzahl	T	Lyse [µl]	Prot [mg/ ml]
				Subst	Konz	[µM]	[h]				
916	2D	HCT-116	Char					3 x T150		650	16,89
917	2D	DLD-1	Char					3 x T150		600	13,79
918	2D	HT-29	Pat Char					4 x T150		1250	8,32
919	2D	GEO	Char					1 x T150		1000	11,06
932	Sph	HT-29	Anz					3	RV	2,5	4,50
933	Sph	HT-29	Anz					3	RV	2,5	5,17
934	Sph	HT-29	Anz					3	RV	5	3,11
935	Sph	HT-29	Anz					3	RV	5	3,11
944	Sph	HT-29	Anz					5	RV	2,5	3,62
945	Sph	HT-29	Anz					5	RV	2,5	3,19
946	Sph	HT-29	Anz					5	RV	5	3,22

#	Art	Abst	Ein- satz	Subst	Behandlung			Anzahl	T	Lyse [μl]	Prot [mg/ ml]
					Konz	[μM]	[h]				
947	Sph	HT-29	Anz					5	RV	5	2,02
1198	2D	HT-29	Präp					1,5x10 ⁵ Z	RV	5	0,43
1199	2D	HT-29	Präp					1,5x10 ⁵ Z	RV	5	0,45
1200	2D	HT-29	Präp					1,5x10 ⁵ Z	RV	5	0,46
1201	2D	HT-29	Präp					1,5x10 ⁵ Z	RV	5	0,51
1202	2D	HT-29	Präp					1,5x10 ⁵ Z	RV	5	0,51
1205	2D	HT-29	Präp					1,5x10 ⁵ Z	Lyo	5	0,49
1206	2D	HT-29	Präp					1,5x10 ⁵ Z	Lyo	5	0,50
1207	2D	HT-29	Präp					1,5x10 ⁵ Z	Lyo	5	0,54
1208	2D	HT-29	Präp					1,5x10 ⁵ Z	Lyo	5	0,48
1215	2D	HT-29	Präp					1,5x10 ⁵ Z	SV	5	0,58
1216	2D	HT-29	Präp					1,5x10 ⁵ Z	SV	5	0,59
1217	2D	HT-29	Präp					1,5x10 ⁵ Z	SV	5	0,59
1218	2D	HT-29	Präp					1,5x10 ⁵ Z	SV	5	0,60
1219	2D	HT-29	Präp					1,5x10 ⁵ Z	SV	5	0,65
1220	2D	HT-29	Präp					1,5x10 ⁵ Z	SV	5	0,64
1229	2D	HT-29	Präp					1,5x10 ⁵ Z	Lyo	5	0,53
1230	2D	HT-29	Präp					1,5x10 ⁵ Z	Lyo	5	0,49
1231	2D	HT-29	Präp					1,5x10 ⁵ Z	RV	5	0,49
1253	Sph	HT-29	RPPA WB	DMSO	0,2 %		46	3	SV	5	1,42
1254	Sph	HT-29	RPPA	DMSO	0,2 %		46	3	SV	5	1,45
1255	Sph	HT-29	RPPA	DMSO	0,2 %		46	3	SV	5	1,48
1256	Sph	HT-29	RPPA WB	DMSO	0,2 %		46	3	SV	5	1,34
1267	Sph	HT-29	RPPA	C1	10xIC ₅₀	10	46	3	SV	5	0,87
1268	Sph	HT-29	RPPA WB	C1	10xIC ₅₀	10	46	3	SV	5	0,95
1269	Sph	HT-29	RPPA WB	C1	10xIC ₅₀	10	46	3	SV	5	0,95
1270	Sph	HT-29	RPPA WB	C1	100xIC ₅₀	100	46	3	SV	5	0,83
1271	Sph	HT-29	RPPA WB	C1	100xIC ₅₀	100	46	3	SV	5	0,86
1272	Sph	HT-29	RPPA	C1	100xIC ₅₀	100	46	3	SV	5	0,98
1273	Sph	HT-29	RPPA WB	C2	10xIC ₅₀	4	46	3	SV	5	0,88
1274	Sph	HT-29	RPPA WB	C2	10xIC ₅₀	4	46	3	SV	5	0,93
1275	Sph	HT-29	RPPA	C2	10xIC ₅₀	4	46	3	SV	5	1,14
1276	Sph	HT-29	RPPA	C2	100xIC ₅₀	40	46	3	SV	5	0,70
1277	Sph	HT-29	RPPA WB	C2	100xIC ₅₀	40	46	3	SV	5	1,03

#	Art	Abst	Ein- satz	Subst	Behandlung			Anzahl	T	Lyse [μ l]	Prot [mg/ ml]
					Konz	[μ M]	[h]				
1278	Sph	HT-29	RPPA WB	C2	100xIC ₅₀	40	46	3	SV	5	1,06
1279	Sph	HT-29	RPPA WB	C5	10xIC ₅₀	0,2	46	3	SV	5	1,21
1280	Sph	HT-29	RPPA WB	C5	10xIC ₅₀	0,2	46	3	SV	5	1,14
1281	Sph	HT-29	RPPA	C5	10xIC ₅₀	0,2	46	3	SV	5	1,59
1282	Sph	HT-29	RPPA	C5	100xIC ₅₀	2	46	3	SV	5	1,17
1283	Sph	HT-29	RPPA WB	C5	100xIC ₅₀	2	46	3	SV	5	1,11
1284	Sph	HT-29	RPPA WB	C5	100xIC ₅₀	2	46	3	SV	5	1,13
1289	Sph	HT-29	Pat	Med			12	3	SV	5	0,57
1290	Sph	HT-29	Pat	Med			12	3	SV	5	0,92
1291	Sph	HT-29	Pat	Med			12	3	SV	5	0,93
1292	Sph	HT-29	Pat	Med			12	3	SV	5	1,19
1293	Sph	HT-29	Pat	Med			12	3	SV	5	1,08
1393	Sph	HT-29	Pat	Med			60	3	SV	5	1,11
1394	Sph	HT-29	Pat	Med			60	3	SV	5	1,12
1493	Sph	P1	Pat					3	SV	5	0,24
1494	Sph	P1	Pat					3	SV	5	0,51
1495	Sph	P1	Pat					3	SV	5	0,28
1496	Sph	P2	Pat					3	SV	5	0,68
1497	Sph	P2	Pat					3	SV	5	0,56
1498	Sph	P2	Pat					3	SV	5	0,35
1703	Sph	P3	Pat					3	SV	5	0,33
1704	Sph	P3	Pat					3	SV	5	0,27
1705	Sph	P3	Pat					3	SV	5	0,35
1706	Sph	P4	Pat					3	SV	5	0,20
1707	Sph	P4	Pat					3	SV	5	0,26
1708	Sph	P4	Pat					3	SV	5	0,38
1719	Sph	P5	Pat Anz	Med			60	3	SV	5	0,36
1720	Sph	P5	Pat Anz	Med			60	3	SV	5	0,33
1721	Sph	P5	Pat Anz	Med			60	3	SV	5	0,37
1722	Sph	P5	Pat Anz	Med			60	5	SV	5	0,43
1723	Sph	P5	Pat Anz	Med			60	5	SV	5	0,38
1724	Sph	P5	Pat Anz	Med			60	5	SV	5	0,43
1725	Sph	P5	Pat Anz	Med			60	10	SV	5	0,60

#	Art	Abst	Ein- satz	Subst	Behandlung			Anzahl	T	Lyse [µl]	Prot [mg/ ml]
					Konz	[µM]	[h]				
1726	Sph	P5	Pat Anz	Med			60	10	SV	5	0,50
1727	Sph	P5	Pat Anz	Med			60	10	SV	5	0,59
1731	Sph	NCCIT	Anz					3	SV	5	0,15
1732	Sph	NCCIT	Anz					3	SV	5	0,16
1733	Sph	NCCIT	Anz					3	SV	5	0,13
1734	Sph	NCCIT	Anz					4	SV	5	0,20
1735	Sph	NCCIT	Anz					4	SV	5	0,19
1736	Sph	NCCIT	Anz					4	SV	5	0,18
1737	Sph	NCCIT	Anz					5	SV	5	0,35
1738	Sph	NCCIT	Anz					5	SV	5	0,27
1739	Sph	NCCIT	Anz					5	SV	5	0,32
1740	Sph	NCCIT	Anz					6	SV	5	0,41
1741	Sph	NCCIT	Anz					6	SV	5	0,52
1742	Sph	NCCIT	Anz					6	SV	5	0,42
1743	Sph	NCCIT	Anz					10	SV	5	0,47
1744	Sph	NCCIT	Anz					10	SV	5	0,52
1745	Sph	NCCIT	Anz					10	SV	5	0,53
1746	Sph	NCCIT	Anz					15	SV	5	0,64
1747	Sph	NCCIT	Anz					15	SV	5	0,53
1748	Sph	NCCIT	Anz					15	SV	5	0,68
1749	Sph	NCCIT	RPPA					10	Lyo	5	0,14
1750	Sph	NCCIT	RPPA					10	Lyo	5	0,13
1751	Sph	NCCIT	RPPA					10	Lyo	5	0,16
1753	Sph	NCCIT	RPPA					10	Lyo	5	0,11
1759	Sph	NCCIT	RPPA	DMSO	0,1 %		0,5	10	Lyo	5	0,15
1760	Sph	NCCIT	RPPA	DMSO	0,1 %		0,5	10	Lyo	5	0,22
1761	Sph	NCCIT	RPPA	DMSO	0,1 %		0,5	10	Lyo	5	0,18
1762	Sph	NCCIT	RPPA	DMSO	0,1 %		0,5	10	Lyo	5	0,14
1767	Sph	NCCIT	RPPA	DMSO	0,1 %		2	10	Lyo	5	0,12
1768	Sph	NCCIT	RPPA	DMSO	0,1 %		2	10	Lyo	5	0,20
1769	Sph	NCCIT	RPPA	DMSO	0,1 %		2	10	Lyo	5	0,19
1770	Sph	NCCIT	RPPA	DMSO	0,1 %		2	10	Lyo	5	0,09
1775	Sph	NCCIT	RPPA	DMSO	0,1 %		6	10	Lyo	5	0,25
1777	Sph	NCCIT	RPPA	DMSO	0,1 %		6	10	Lyo	5	0,32
1778	Sph	NCCIT	RPPA	DMSO	0,1 %		6	10	Lyo	5	0,19
1783	Sph	NCCIT	RPPA	DMSO	0,1 %		24	10	Lyo	5	0,32
1784	Sph	NCCIT	RPPA	DMSO	0,1 %		24	10	Lyo	5	0,37

#	Art	Abst	Ein- satz	Subst	Behandlung			Anzahl	T	Lyse [μl]	Prot [mg/ ml]
					Konz	[μM]	[h]				
1791	Sph	NCCIT	RPPA	DMSO	0,1 %		48	10	Lyo	5	0,39
1793	Sph	NCCIT	RPPA	DMSO	0,1 %		48	10	Lyo	5	0,51
1794	Sph	NCCIT	RPPA	DMSO	0,1 %		48	10	Lyo	5	0,52
1795	Sph	NCCIT	RPPA	DMSO	0,1 %		48	10	Lyo	5	0,47
1799	Sph	NCCIT	RPPA	C1	1xIC ₅₀	2	0,5	10	Lyo	5	0,18
1800	Sph	NCCIT	RPPA	C1	1xIC ₅₀	2	0,5	10	Lyo	5	0,16
1801	Sph	NCCIT	RPPA	C1	1xIC ₅₀	2	0,5	10	Lyo	5	0,14
1802	Sph	NCCIT	RPPA	C1	1xIC ₅₀	2	2	10	Lyo	5	0,11
1803	Sph	NCCIT	RPPA	C1	1xIC ₅₀	2	2	10	Lyo	5	0,16
1804	Sph	NCCIT	RPPA	C1	1xIC ₅₀	2	2	10	Lyo	5	0,24
1805	Sph	NCCIT	RPPA	C1	1xIC ₅₀	2	6	10	Lyo	5	0,11
1806	Sph	NCCIT	RPPA	C1	1xIC ₅₀	2	6	10	Lyo	5	0,19
1807	Sph	NCCIT	RPPA	C1	1xIC ₅₀	2	6	10	Lyo	5	0,21
1808	Sph	NCCIT	RPPA	C1	1xIC ₅₀	2	24	10	Lyo	5	0,15
1809	Sph	NCCIT	RPPA	C1	1xIC ₅₀	2	24	10	Lyo	5	0,20
1810	Sph	NCCIT	RPPA	C1	1xIC ₅₀	2	24	10	Lyo	5	0,27
1811	Sph	NCCIT	RPPA	C1	1xIC ₅₀	2	48	10	Lyo	5	0,18
1812	Sph	NCCIT	RPPA	C1	1xIC ₅₀	2	48	10	Lyo	5	0,37
1813	Sph	NCCIT	RPPA	C1	1xIC ₅₀	2	48	10	Lyo	5	0,40
1814	Sph	NCCIT	RPPA	C1	10xIC ₅₀	20	0,5	10	Lyo	5	0,11
1815	Sph	NCCIT	RPPA	C1	10xIC ₅₀	20	0,5	10	Lyo	5	0,17
1816	Sph	NCCIT	RPPA	C1	10xIC ₅₀	20	0,5	10	Lyo	5	0,13
1817	Sph	NCCIT	RPPA	C1	10xIC ₅₀	20	2	10	Lyo	5	0,25
1818	Sph	NCCIT	RPPA	C1	10xIC ₅₀	20	2	10	Lyo	5	0,21
1819	Sph	NCCIT	RPPA	C1	10xIC ₅₀	20	2	10	Lyo	5	0,14
1820	Sph	NCCIT	RPPA	C1	10xIC ₅₀	20	6	10	Lyo	5	0,16
1821	Sph	NCCIT	RPPA	C1	10xIC ₅₀	20	6	10	Lyo	5	0,26
1822	Sph	NCCIT	RPPA	C1	10xIC ₅₀	20	6	10	Lyo	5	0,21
1823	Sph	NCCIT	RPPA	C1	10xIC ₅₀	20	24	10	Lyo	5	0,08
1824	Sph	NCCIT	RPPA	C1	10xIC ₅₀	20	24	10	Lyo	5	0,26
1825	Sph	NCCIT	RPPA	C1	10xIC ₅₀	20	24	10	Lyo	5	0,29
1826	Sph	NCCIT	RPPA	C1	10xIC ₅₀	20	48	10	Lyo	5	0,15
1827	Sph	NCCIT	RPPA	C1	10xIC ₅₀	20	48	10	Lyo	5	0,13
1828	Sph	NCCIT	RPPA	C1	10xIC ₅₀	20	48	10	Lyo	5	0,13
1829	Sph	NCCIT	RPPA	C2	1xIC ₅₀	2	0,5	10	Lyo	5	0,15
1830	Sph	NCCIT	RPPA	C2	1xIC ₅₀	2	0,5	10	Lyo	5	0,20
1831	Sph	NCCIT	RPPA	C2	1xIC ₅₀	2	0,5	10	Lyo	5	0,18
1832	Sph	NCCIT	RPPA	C2	1xIC ₅₀	2	2	10	Lyo	5	0,25

#	Art	Abst	Ein- satz	Subst	Behandlung			Anzahl	T	Lyse [µl]	Prot [mg/ ml]
					Konz	[µM]	[h]				
1833	Sph	NCCIT	RPPA	C2	1xIC ₅₀	2	2	10	Lyo	5	0,29
1834	Sph	NCCIT	RPPA	C2	1xIC ₅₀	2	2	10	Lyo	5	0,27
1835	Sph	NCCIT	RPPA	C2	1xIC ₅₀	2	6	10	Lyo	5	0,21
1836	Sph	NCCIT	RPPA	C2	1xIC ₅₀	2	6	10	Lyo	5	0,23
1837	Sph	NCCIT	RPPA	C2	1xIC ₅₀	2	6	10	Lyo	5	0,27
1838	Sph	NCCIT	RPPA	C2	1xIC ₅₀	2	24	10	Lyo	5	0,24
1839	Sph	NCCIT	RPPA	C2	1xIC ₅₀	2	24	10	Lyo	5	0,28
1840	Sph	NCCIT	RPPA	C2	1xIC ₅₀	2	24	10	Lyo	5	0,28
1841	Sph	NCCIT	RPPA	C2	1xIC ₅₀	2	48	10	Lyo	5	0,11
1842	Sph	NCCIT	RPPA	C2	1xIC ₅₀	2	48	10	Lyo	5	0,37
1843	Sph	NCCIT	RPPA	C2	1xIC ₅₀	2	48	10	Lyo	5	0,22
1844	Sph	NCCIT	RPPA	C2	10xIC ₅₀	20	0,5	10	Lyo	5	0,16
1845	Sph	NCCIT	RPPA	C2	10xIC ₅₀	20	0,5	10	Lyo	5	0,23
1846	Sph	NCCIT	RPPA	C2	10xIC ₅₀	20	0,5	10	Lyo	5	0,23
1847	Sph	NCCIT	RPPA	C2	10xIC ₅₀	20	2	10	Lyo	5	0,26
1848	Sph	NCCIT	RPPA	C2	10xIC ₅₀	20	2	10	Lyo	5	0,22
1849	Sph	NCCIT	RPPA	C2	10xIC ₅₀	20	2	10	Lyo	5	0,22
1850	Sph	NCCIT	RPPA	C2	10xIC ₅₀	20	6	10	Lyo	5	0,19
1851	Sph	NCCIT	RPPA	C2	10xIC ₅₀	20	6	10	Lyo	5	0,22
1852	Sph	NCCIT	RPPA	C2	10xIC ₅₀	20	6	10	Lyo	5	0,18
1853	Sph	NCCIT	RPPA	C2	10xIC ₅₀	20	24	10	Lyo	5	0,24
1854	Sph	NCCIT	RPPA	C2	10xIC ₅₀	20	24	10	Lyo	5	0,26
1855	Sph	NCCIT	RPPA	C2	10xIC ₅₀	20	24	10	Lyo	5	0,20
1857	Sph	NCCIT	RPPA	C2	10xIC ₅₀	20	48	10	Lyo	5	0,09
1858	Sph	NCCIT	RPPA	C2	10xIC ₅₀	20	48	10	Lyo	5	0,11
2976	2D	NCCIT	Char					2 x T150		700	10,91
2996	Sph	NCCIT	WB	C1	10xIC ₅₀	10	6	ca. 192	RV	25	3,16
2997	Sph	NCCIT	WB	C1	10xIC ₅₀	10	24	ca. 192	RV	25	3,92
3004	Sph	NCCIT	WB	C2	10xIC ₅₀	4	6	ca. 192	RV	25	4,05
3005	Sph	NCCIT	WB	C2	10xIC ₅₀	4	24	ca. 192	RV	25	5,81
3008	Sph	NCCIT	WB	C5	10xIC ₅₀	0,2	6	ca. 192	RV	25	4,09
3009	Sph	NCCIT	WB	C5	10xIC ₅₀	0,2	24	ca. 192	RV	25	4,13
3012	Sph	NCCIT	WB	DMSO	0,1 %		6	ca. 576	RV	80	3,23
3013	Sph	NCCIT	WB	DMSO	0,1 %		24	ca. 576	RV	80	4,69
3014	Sph	NCCIT	WB					ca. 768	RV	60	4,00
3016	2D	HeLa	WB					6-well		250	3,97
3017	2D	HeLa	WB	Colce mid	50 ng/ml		24	6-well		250	2,40
3018	2D	HeLa	WB	HBSS	0,5 %		24	6-well		250	3,56

#	Art	Abst	Ein- satz	Subst	Behandlung			Anzahl	T	Lyse [μ l]	Prot [mg/ ml]
					Konz	[μ M]	[h]				
3019	2D	HeLa	WB	Paclita xel	0,1 μ g/ml		24	6-well	250	2,06	
3020	2D	HeLa	WB	DMSO	0,01 %		24	6-well	250	3,70	

10. Publikationsliste

10.1 Publikationen

Heubach Y, Planatscher H, Sommersdorf C, Maisch D, Maier J, Joos TO, Templin MF, Poetz O

FROM SPOTS TO BEADS - PTM-PEPTIDE BEAD ARRAYS FOR THE CHARACTERISATION OF ANTI-HISTONE ANTIBODIES

Proteomics (2013)

Braeuning A, Heubach Y, Knorpp T, Kowalik MA, Templin M, Columbano A, Schwarz M

GENDER-SPECIFIC INTERPLAY OF SIGNALING THROUGH B-CATENIN AND CAR IN THE REGULATION OF XENOBIOTIC-INDUCED HEPATOCYTE PROLIFERATION

Toxicological Sciences (2011) 123, 113–122

10.2 Kongressvorträge

SIGNALING NETWORKS IN DRUG EFFICACY SCREENING: PROTEIN MICROARRAYS FOR ANALYZING TUMOR SPHEROIDS

November 2012 in Boston, MA, USA „2nd Cancer Epigenetics“

ANALYSIS OF SIGNALING NETWORKS IN DRUG DISCOVERY: COMBINING TUMOR SPHEROID AND PROTEIN MICROARRAY TECHNOLOGY IN DRUG EFFICACY SCREENING

Februar 2011 in Frankfurt „*Functional genomics - next generation applications and technologies*“

10.3 Posterpräsentationen

Heubach Y, Breitinge E, Gierke B, Knorpp T, Kohlhof H, Mayer B, Strobl S, Pawlak M, Templin MF

ANALYSIS OF SIGNALING NETWORKS IN DRUG DISCOVERY: COMBINING TUMOR SPHEROID AND PROTEIN MICROARRAY TECHNOLOGY IN DRUG EFFICACY SCREENING

Juni 2012 in Leipzig „4th SBMC: Systems Biology of Mammalian Cells“

Heubach Y, Knorpp T, Breitinge E, Mayer B, Strobl S, Pawlak M, Templin MF

COMBINING SPHEROID AND REVERSE PHASE MICROARRAY TECHNOLOGY FOR THE ANALYSIS OF CANCER SIGNALING NETWORKS AND TREATMENT RESPONSE

Juni 2010 in Freiburg „MedSys Status Seminar“

Heubach Y, Knorpp T, Braeuning A, Schwarz M, Templin MF

REVERSE PHASE PROTEIN MICROARRAYS FOR THE ANALYSIS OF SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS

Juni 2010 in Freiburg „3rd SBMC: Systems Biology of Mammalian Cells“

Heubach Y, Knorpp T, Braeuning A, Marx-Stoelting P, Schwarz M, Templin MF

MICROARRAY BASED PROTEIN PROFILING OF LIVER TISSUE OF MICE TREATED WITH THE TUMOR PROMOTER PHENOBARBITAL

Februar 2010 in Frankfurt „12th Status Seminar Chip Technologies“

Heubach Y, Knorpp T, Braeuning A, Schwarz M, Templin MF

REVERSE PHASE PROTEIN MICROARRAYS FOR THE ANALYSIS OF SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS

August 2009 in Brixen, Italien „3rd European summer school in proteomic basics“

Heubach Y, Knorpp T, Braeuning A, Schwarz M, Templin MF

ARRAY BASED PROTEIN EXPRESSION ANALYSIS: CELL SIGNALING IN B-CATENIN DEFICIENT MURINE LIVER AFTER TREATMENT WITH NON-GENOTOXIC CARCINOGENS

März 2009 in Frankfurt „11th Status Seminar Chip Technologies“

März 2009 in Alpbach, Österreich „Affinity Proteomics Workshop“